



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Interrelación entre la respuesta a sombra y la síntesis de carotenoides en *Arabidopsis thaliana*

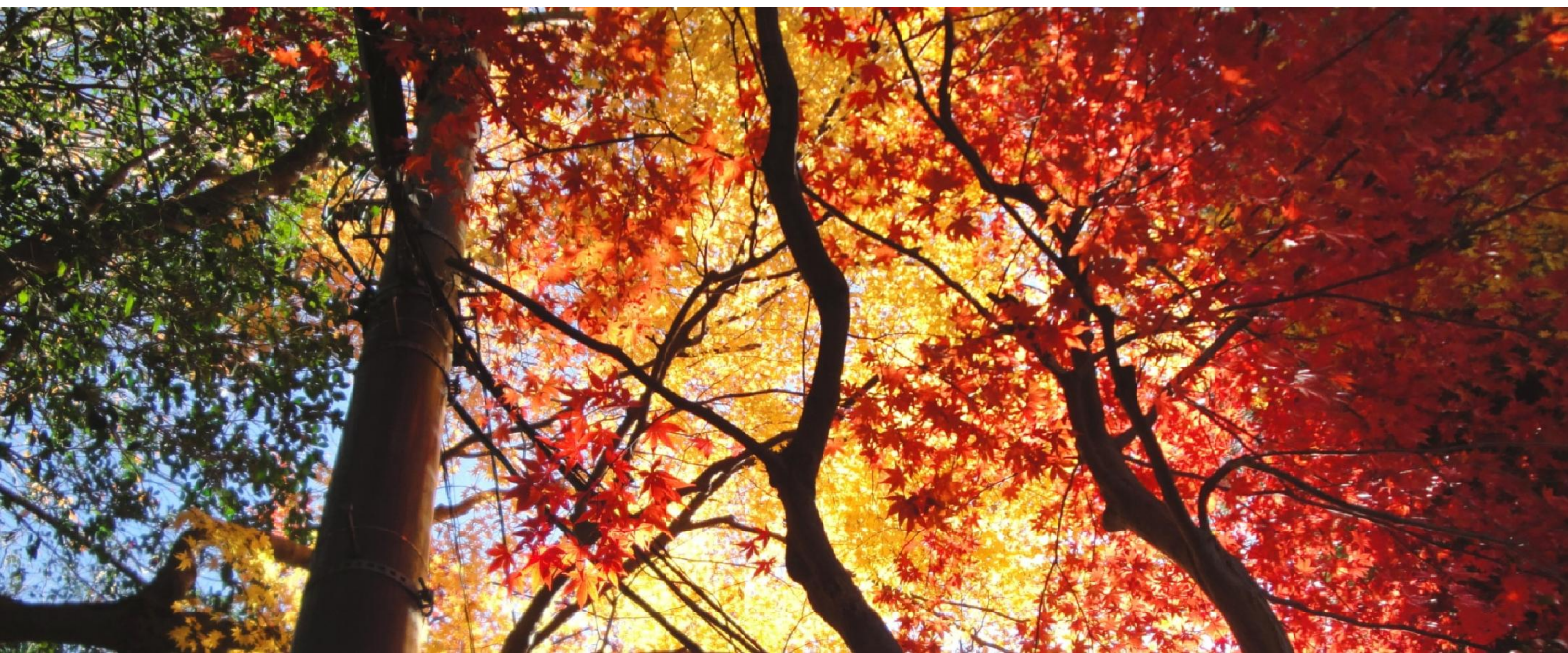
Miriam Ortiz Alcaide

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Interrelación entre la respuesta a
sombra y la síntesis de carotenoides
en *Arabidopsis thaliana*



Miriam Ortiz Alcaide
TESIS DOCTORAL

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

Interrelación entre la respuesta a
sombra y la síntesis de carotenoides en
Arabidopsis thaliana

Miriam Ortiz Alcaide

2017

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOTECNOLOGIA

Interrelación entre la respuesta a
sombra y la síntesis de carotenoides en
Arabidopsis thaliana

Memòria presentada per Miriam Ortiz Alcaide per optar al títol
de doctor per la Universitat de Barcelona

El director de la tesis:

El tutor:

El candidat a doctor:

**Manuel
Rodríguez Concepción**

**Teresa
Altabella**

**Miriam
Ortiz Alcaide**

Miriam Ortiz Alcaide

2017

Agradecimientos:

Las experiencias y el contexto tienen un rol muy importante en el resultado de lo que somos hoy. Hay muchísimas personas durante toda mi vida, y en particular durante esta trayectoria en el CRAG, que han impactado en mí y gracias a ellas soy como soy y les estoy profundamente agradecida. Por un lado, gracias a unas me he planteado hacer la tesis doctoral y otras me han ayudado en su realización propiamente dicha. Por eso, esta tesis es el resultado de múltiples aportaciones. Durante este trayecto cada persona de mi alrededor ha puesto un granito de arena para que se haga realidad esta tesis: aportando puntos de vista, aportaciones científicas, apoyo de cualquier tipo o simplemente con una sonrisa y una palabra de aliento.

Primero de todo me gustaría agradecer a Manuel, por haberme dado la oportunidad de embarcarme en esta aventura, por todo su apoyo científico y también humano. Me siento agradecida, pues siempre ha intentado sacar lo mejor de mí y siempre se ha mostrado predispuesto a hablar y ayudarme en todo lo que pudiera. También al Manolo Lab por todas las aportaciones, el apoyo, consejos y las risas que hemos pasado durante todo este tiempo. Gracias a todos: Aguila, Briardo, Cata, Ernesto, Jordi, Lucio, Miguel, Rosa, Sofía y Vicky!. También quiero agradecer especialmente al Jaume Lab. Gracias Jaume por todas las facilidades que nos has dado, por tus consejos científicos y tus puntos de vista, así como todas tus sugerencias y revisiones del manuscrito. Gracias M^a José por todas tus aportaciones científicas y psicológicas, por esas palabras de ánimo siempre! También me gustaría dar las gracias a Norma, por las charlas de todo tipo que hemos mantenido, a bordo o no del Seat ;).

Gracias a Akira Nagatani de la Universidad de Kyoto por hacer posible una gran experiencia tanto a nivel científico como personal :). Por ser un gran anfitrión y hacerme sentir siempre como en casa.

Después de tanto tiempo en el CRAG... (empecé con prácticas, luego en una spin-off y finalmente realicé el doctorado!) he conocido a mucha gente especial, de alguna manera, estas personas también han contribuido a la realización de esta tesis. Algunas me sirvieron de inspiración en mis primeros pasos en el mundo de la investigación, con ellas vislumbré los primeros “hundimientos del corchito”, inolvidables para mí!. Nunca olvidaré los primeros clonajes con mi mentora Inma Hernandez y Josep M^a Casacuberta, las risas con el grupillo de Helene Gomeperez, Erika M^a de Jesus y Andrej Benjak. Ellos, me pusieron en contacto con la investigación y sembraron alguna semilla que ha sido causante de que al final quisiera hacer la tesis.

Remontándome al pasado, también fue un gran impacto para mí, mi estancia en el laboratorio de Dolors Ludevid. Gracias Lola, por contar conmigo tantos años y darme la oportunidad de conocer el mundo que encabalga la academia con la empresa. Fue una

experiencia súper enriquecedora. Gracias por las conversaciones que tuvimos sobre la vida y sobre la investigación en si y siempre motivarme en todo en lo que emprendía. Dentro del laboratorio, gracias Marga por ser así de entrañable y por tus puntos de vista, gracias Imma Llop por tu ejemplo en tu excelente forma de planificación y de trabajo. Esther, mi compañera de batallas! Qué bien lo pasamos trabajando codo con codo! Y con admiración mútua :). Y gracias Maite siempre por estar atenta para ayudar en todo lo que te fuera posible y también participar en esas risas :)

También muchas gracias a Michael Phillips, por enseñarme tu forma de trabajo impecable, tus explicaciones y depositar tu confianza en mi durante el tiempo que estuve contigo.

También me gustaría agradecer a todos los servicios que del CRAG que han convivido conmigo durante estos 10 años. Gracias al servicio de invernaderos, que siempre me ha cuidado las plantitas y por ser tan agradables! Gracias Pilar por el cuidado de esos tabacos y Arabidopsis. Gracias Eva, Mina y Alejandro por vuestra predisposición siempre para ayudar. Gracias Montse por ayudarme con el microscopio confocal, a Mercè Miquel por las secuencias, a Sami Irar por sus consejos en proteómica.

Por último, y no por ello menos importante, muchas gracias a mi madre, a mi padre y Miguel. Ellos son las raíces de lo que soy y de esta tesis. Gracias por depositar una total confianza en mi y un cariño más allá de cualquier logro. Gracias por querer mi felicidad siempre, promoverme a hacer lo que más me gustara y darme todas las facilidades dentro de vuestras posibilidades. Sin mis padres y el empujón de mi hermano, no habría podido estudiar biología en Girona. Les debo muchísimo, y no solo eso, sino que no habría podido conocer a Armand. Mi gran compañero de camino.

Armand, muchas gracias por todo, cariño. Gracias por creer siempre en mi, por esa incondicionalidad tuya :). Eres un tesoro enorme! Gracias por enriquecerme día a día. En esta tesis, gracias por ayudarme tantísimo con todo, por tus puntos de vista durante la tesis y a charlar de temas científicos y filosóficos. Me siento muy agradecida de haberte encontrado.

Muchas gracias a todos!!!

También me siento agradecida por haber tenido la experiencia de investigar. A veces, la investigación me recuerda un poco al arte de la pesca. Cuando un pescador al que le gusta la pesca, está pescando, es capaz de esperar el tiempo que haga falta hasta que algo suceda. El momento mágico del pescador, es el que llamo “el hundimiento del corchito”. Es el momento en el que encuentra un cambio de patrón, una diferencia no observada anteriormente. En ese preciso momento, el pescador siente una gran satisfacción, una gran ilusión y esperanza de haber pescado algo aunque aún no lo ve.

Pues bien, los que nos dedicamos a la investigación científica vivimos algo similar cuando un experimento nos sorprende proporcionando un resultado valioso imprevisto. En ese instante la naturaleza muestra uno de sus infinitos secretos y “el corchito” se hunde veloz en el océano del misterio proporcionándonos una pista, un cambio de patrón. Y lo más bonito, es que estamos ahí como primeros observadores de ello, sintiéndonos por un momento como Robinson Crusoe en una tierra virgen e inexplorada.

Durante este doctorado he tenido la suerte de presenciar en primera persona varios “hundimientos del corchito” :) y he de decir que es maravilloso, para mí es una de las cosas más bonitas de esta profesión.

Con la experiencia de quien ha pasado ya varios años en investigación, pienso que no solo es importante disfrutar “del hundimiento del corchito”, sino que también hay que aprender a disfrutar de toda la experiencia de “pesca”: aprender a observar el sol, el viento, sopesar tal vez el cambio de lago o tal vez de anzuelo... entre hundimiento y hundimiento. En cómo se afronte esa espera, (que no es para nada pasiva, sino que requiere de observación, análisis y pruebas) y que implica enfrentarse al temor de no tener “peces” para exponer en el “mercado” -y a la propia auto exigencia, radica bajo mi punto de vista, un punto clave de una vida científica saludable y creativa.

Disfrutemos de la “pesca”! :)

*A mi madre, a mi padre y a mi hermano por
su cariño incondicional.*

*A Armand por sus puntos de vista y apoyo en
todo momento. Me siento feliz por todo el
camino andado y el que nos queda por andar...*

*....y a Milan, mi compañero inseparable de
escritura, especialista en pataditas
tranquilizadoras :)*

Resumen

Los carotenoides son pigmentos fotosintéticos con un papel esencial para la protección de los cloroplastos frente al daño fotooxidativo causado por el exceso de irradiación solar. Cuando las plantas crecen en alta densidad o bajo sombra, sin embargo, la síntesis de carotenoides se reprime para adaptarse a las nuevas condiciones de luz. Esta respuesta forma parte del denominado síndrome de huida de la sombra (SAS), un proceso adaptativo que también implica el alargamiento de las plantas para competir con sus vecinas en busca de luz. En esta tesis se ha estudiado la interrelación entre estas dos respuestas a sombra utilizando la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. El primer objetivo ha sido **estudiar los factores implicados en la regulación de la biosíntesis de carotenoides en respuesta a sombra**. Nuestros resultados han determinado que durante el SAS la síntesis de carotenoides se encuentra regulada por un balance dinámico entre módulos transcripcionales formados por reguladores positivos (como PAR1) y reguladores negativos (como los miembros del cuarteto PIFq y otros factores de transcripción de la familia bHLH). Un mecanismo similar, pero empleando componentes distintos, regula también la elongación del hipocotilo como parte del SAS. Por otro lado, cuando una planta sombreada recibe un exceso de luz (por ejemplo, rayos de sol por huecos en el dosel arbóreo), se pueden producir daños en los cloroplastos que comprometan su capacidad fotosintética. Para evitar estos efectos perjudiciales, los cloroplastos afectados envían señales al núcleo para responder al estrés (señales retrógradas). Dado que algunas de estas señales derivan de la degradación oxidativa de los carotenoides (como el ABA y el β -ciclocitral), la segunda parte de la tesis se ha centrado en **investigar si el estado fisiológico de los cloroplastos y las señales retrógradas modulan la respuesta a sombra**. Por una parte, hemos demostrado que los cloroplastos estresados generan señales retrógradas independientes de carotenoides que reprimen la desactivación de los fitocromos y favorecen la acumulación del factor de transcripción HY5 para la represión de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra. Además, de manera independiente a HY5, derivados de carotenoides como el ABA y el β -ciclocitral actúan como represores de esta respuesta. Por lo tanto, hemos demostrado que la sombra regula la síntesis de carotenoides que, a su vez, regulan la respuesta de crecimiento a sombra.

Indice

Introducción.....	1
Planteamiento general.....	1
1. Carotenoides: Funciones.....	2
1.1 Los carotenoides: mucho más que pigmentos.....	2
1.2 Biosíntesis de carotenoides.....	3
1.2.1 Generación de precursores (IPP y DMAPP).....	3
1.2.2 De IPP y DMAPP a carotenoides	5
1.2.3 De carotenoides a apocarotenoides	6
1.2.4 Regulación de la biosíntesis de carotenoides	6
2. La luz como fuente de información para las plantas	8
2.1 Percepción: los fotorreceptores fitocromos	8
2.2 Transducción: el modelo de desetiolación.....	10
2.3 Regulación de la síntesis de carotenoides durante la desetiolación	12
2.4 Síndrome de huida de la sombra (SAS):.....	13
2.5 Regulación de la síntesis de carotenoides durante el SAS.....	15
3. Las señales retrógradas: el lenguaje de los cloroplastos	15
3.1 Señales retrógradas y biogénesis del cloroplasto.	18
3.1.1 Señales retrógradas dependientes de tetrapirroles	18
3.1.2 Señales retrógradas dependientes del PGE	20
3.2 Señales retrógradas operacionales	22
3.3 Señales retrógradas y carotenoides.....	23
3.4 Señales retrógradas y luz	25
Objetivos.....	29
Resultados	33
Capítulo 1: Regulación de la síntesis de carotenoides en respuesta a sombra	33
1.1 Papel de los PIFs	33
1.2 Papel de HY5	36
1.3 Papel de PAR1	37
1.4 Papel de proteínas interactoras de PAR1.....	39
Capítulo 2: Papel de los carotenoides en la respuesta a sombra	44
2.1 La respuesta a sombra requiere cloroplastos funcionales.....	44
2.1.1 Puesta a punto del sistema experimental.....	44

2.1.2 Las plantas con cloroplastos disfuncionales tienen reprimida la respuesta a sombra	47
2.1.3 Las plantas albinas no son constitutivamente hiposensibles a luz	53
2.1.4 La ausencia de cloroplastos funcionales desacelera la inactivación del fitocromo B en respuesta a sombra.....	56
2.2 La respuesta a sombra en plantas albinas está reprimida por HY5 y carotenoides	59
2.2.1 Búsqueda de mutantes capaces de responder a sombra sin cloroplastos funcionales.	59
2.2.2 HY5 reprime la elongación del hipocotilo antes y después de la exposición a sombra	61
2.2.3 La respuesta a sombra de plantas sin cloroplastos ni HY5 requiere un bloqueo específico de la síntesis de carotenoides	63
2.3 Varias señales retrógradas derivadas de carotenoides reprimen la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra.....	69
2.3.1 MEcPP y ruta del MEP	69
2.3.2 Luteína o derivados.....	71
2.2.3 β -ciclocitral.....	72
2.3.4 Ácido absínico (ABA).....	75
2.3.5 Interacción entre β -ciclocitral y ABA.....	77
2.3.6 Otras señales retrógradas	79
2.4 Mecanismo de acción de HY5 y ABA como represores independientes de la respuesta a sombra.....	82
2.4.1 Las señales retrógradas aumentan los niveles de HY5	82
2.4.2 HY5 se acumula en respuesta a sombra para regular la expresión génica	86
2.4.3 Ni HY5 ni el ABA afectan a la percepción de la sombra por phyB.....	89
Discusión	95
1. La sombra regula la síntesis de carotenoides mediante vías primarias de señalización lumínica	95
1.1 PIFq (pero no PIF7) reprimen la biosíntesis de carotenoides en respuesta a sombra.	95
1.2 HY5 no regula la biosíntesis de carotenoides en respuesta a sombra.....	96
1.3 PAR1 es un regulador positivo de la síntesis de carotenoides mediante su interacción con PIFs	97
1.4 PAR1 interacciona con otros factores de transcripción para regular la biosíntesis de carotenoides en sombra	98
1.5 Un modelo para la regulación de la síntesis de carotenoides en respuesta a sombra	101

2. Los carotenoides generan señales retrógradas que reprimen la respuesta a sombra	103
2.1 La respuesta a sombra requiere de cloroplastos fotosintéticamente activos	104
2.2 Los cloroplastos disfuncionales modulan la percepción y la señalización de luz via fitocromos	105
2.2.1 Los cloroplastos modulan la percepción de luz por los fitocromos.....	105
2.2.2 Los cloroplastos modulan las vías de transducción de la señal de sombra vía HY5	107
2.2.2.1 HY5 y señales GUN	108
2.2.2.2 Nuevo rol de HY5 como represor del SAS.....	109
2.2.3 Derivados de carotenoides reprimen la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra	111
2.2.3.1 ABA como señal retrógrada	112
2.2.3.2 Otros derivados de carotenoides.....	113
2.3 Un modelo integrador del papel de HY5, las señales retrógradas y los apocarotenoides en la regulación de la respuesta a sombra	115
Materiales y métodos	127
1. Material vegetal	127
1.1 Líneas de ganancia o pérdida de función.....	127
1.2 Condiciones de crecimiento de plantas adultas.....	128
1.3 Condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	129
2. Vectores y construcciones	131
3. Oligonucleótidos	132
4. Generación de construcciones.....	134
4.1 . Material	134
4.2 Métodos de clonaje de genes	135
4.2.1 PCR	135
4.2.2 Introducción de fragmentos de ADN en vectores plasmídicos.....	136
4.2.3 Transformación de <i>Escherichia coli</i>	138
4.2.4 Digestión con enzimas de restricción y reacción Klenow	139
4.2.5 Electroforesis en gel de agarosa y purificación de bandas	139
4.2.6 Secuenciación.....	140
5. Generación de plantas transgénicas	140
5.1 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con la construcción deseada....	140
5.2. Transformación transitoria en tabaco.....	140
5.3 Transformación estable de <i>Arabidopsis</i> mediante <i>Agrobacterium</i>	142

6. Genotipado de líneas mutantes de <i>Arabidopsis</i>	143
6.1 Extracción de ADN genómico para genotipar	143
6.2 Método de genotipado de líneas mutantes de <i>Arabidopsis</i>	144
7. Generación de dobles mutantes	144
8. Determinación de niveles de transcritos	145
8.1 Extracción de ARN	145
8.2 Cuantificación de ARN	145
8.3 RT-PCR.	146
8.4 PCR cuantitativa	146
9. Determinación de niveles de proteína.....	147
9.1 Extracción de proteínas.....	147
9.2 Determinación de la cantidad de proteína total.....	148
9.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida	148
9.4 Western-blot	150
9.5 Cuantificación de señal bioluminiscente.....	151
10. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	152
10.1 <i>Crosslink</i> de la muestra vegetal.....	152
10.2 Preparación de los <i>Dynabeads</i>	152
10.3 Extracción de la muestra vegetal	153
10.4 Lavados y elución del ADN	154
10.5 Recuperación del ADN	155
11. Cuantificación de pigmentos.....	156
11.1 Espectrofotometría	156
11.2 HPLC- DAD	157
11.3 Determinación de niveles de clorofila “ <i>in vivo</i> ”	158
12. Imagen y Microscopía	158
12.1 Lupa	158
12.1 Microscopía laser confocal.....	158
12.3 . Fotografía	159
Bibliografía	163
Publicaciones	185

Abreviaturas:

AAO3	Oxidasa aldheídica 3
ABA	Ácido Abscísico
B	Luz azul
BRs	Brasinoesteroides
CAP	Cloramfenicol
CCDs	<i>Carotenoid cleavage dioxigenases</i>
CLM	Clomazona
COP1	<i>Constitutive photomorphogenic 1</i>
CPTA	2-(4 clorofeniltio) trietilamina
CRTISO	Carotenoide isomerasa
Dex	Dexametasona
DHA	Dihidro-actinidiólido
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DXP	Desoxixilulosa 5-fosfato
DXR	DXP reductoisomerasa
DXS	DXP sintasa
EBL	Epibrasinólido
EX	<i>Executer</i>
EXP2	<i>Expansin 2</i>
FR	Luz roja lejana
FSM	Fosmidomicina
FPP	Farnesil difosfato
GA₃	Ácido giberélico
G3P	Gliceraldeído 3-fosfato
GAs	Giberelinas
GGPP	Geranilgeranil difosfato
GPP	Geranil difosfato
GUN	<i>Genome uncoupled</i>
HAT2	<i>Homebox Arabidopsis thaliana 2</i>
HDR	HMBPP reductasa
HDS	HMBPP sintasa

HFR1	<i>Long hypocotyl in FR</i>
HMBPP	(E)- 4-hidroxi-3metilbut-2-enil difosfato
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilgluratil-CoA
HMGR	3-hidroxi-3-metilgluratil-CoA reductasa
HY1	<i>Long hypocotyl 1</i>
HY5	<i>Long hypocotyl 5</i>
HYH	<i>HY5 homolog</i>
IAA	Acido idolacético
IAA7	<i>Indole acetic acid 7</i>
IPP	Isopentenil difosfato
LIN	Lincomicina
LYCB	Licopeno ciclasa β
LYCE	Licopeno ciclasa ϵ
MEcPP	Metileritriol ciclodifosfato
MEP	Metileritrol difosfato
MVA	Mevalonato
NCED	<i>9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase</i>
NFZ	Norflurazon
NSY	Neoxantina sintasa
PAP	3'- fosfoadenosina 5' fosfato
PAR	<i>Photosynthetically active radiation</i>
PAR1	<i>Phytochrome rapidly regulated 1</i>
PDS	Fitoeno desaturasa
PEP	<i>Plastid-encoded RNA polymerase</i>
PET	<i>Photosynthetic electron transport chain</i>
PGE	<i>Plastid genome expression</i>
PhANGs	<i>Photosynthetic Associated Nuclear Genes</i>
PHY	Fitocromo (Proteína)
phy	Fitocromo activo
PIC	Picloram
PIFs	<i>Phytochrome interacting factors</i>
PIL1	<i>Phytochrome interacting factor-like 1</i>
PQ	Plastoquinona
PQH₂	Plastoquinol

PRANGs	<i>Plastid redox asociated nuclear genes</i>
PSY	Fitoeno sintasa
R	Luz roja
R/FR	Ratio R:FR
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SAL1	3'(2'), 5'-bifosfato nucleosidasa
SAS	Síndrome de huida de la sombra
STN7	<i>State transition 7</i>
VDE	Violaxantina depoxilasa
XTH	Endo transglucosilasa/ Hidrolasa
ZDS	ζ-caroteno desaturasa
ZEP	Zeaxantina epoxidasa
ZISO	15-cis- ζ -caroteno isomerasa
W	Luz blanca

Introducción

Planteamiento general

Los carotenoides son un grupo de pigmentos isoprenoides que colorean de amarillo, naranja y rojo muchas frutas y hortalizas (como los plátanos, las zanahorias, o los tomates). Pero su papel esencial en plantas está en los cloroplastos, donde protegen frente al daño fotooxidativo causado por el exceso de irradiación solar.

Por otro lado, en presencia de alta densidad vegetal, las plantas han de adaptarse y competir con sus vecinas por mejores condiciones de luz. En estas condiciones, en las plantas intolerantes a sombra se induce el denominado síndrome de huida de la sombra (SAS), un proceso adaptativo que engloba diferentes respuestas fisiológicas. La respuesta más estudiada hasta ahora es la inducción de la elongación del hipocotilo en busca de luz. Otra de las respuestas fisiológicas del SAS es la disminución en la cantidad de pigmentos fotosintéticos, incluyendo los carotenoides. Aunque esta disminución probablemente es fundamental para la correcta adaptación de la planta a las nuevas condiciones ambientales, aún se desconoce su regulación. El estudio de factores implicados en la **regulación de la biosíntesis de carotenoides en respuesta a sombra** es el primer objetivo de esta tesis.

Cuando el exceso de luz u otros tipos de estrés oxidativo dejan de estar controlados, se producen daños en los cloroplastos que pueden llegar a comprometer la capacidad fotosintética y el crecimiento vegetal. Para evitar estos efectos perjudiciales, los cloroplastos estresados son capaces de enviar señales al núcleo (señales retrógradas, algunas de ellas derivadas de carotenoides) para reducir la expresión de genes fotosintéticos y ajustar el desarrollo de la planta. La segunda parte de la tesis se ha centrado en investigar el **papel de las señales retrógradas derivadas de carotenoides en la respuesta a sombra**.

1. Carotenoides: Funciones

1.1 Los carotenoides: mucho más que pigmentos

Los carotenoides son un grupo de isoprenoides que se caracterizan por su pigmentación desde el amarillo al rojo, debido a que poseen una cadena polieno que actúa como cromóforo (Ruiz-Sola & Rodríguez-Concepción 2012). Se sintetizan por todos los organismos fotosintéticos y algunos no fotosintéticos como bacterias o hongos. Los animales no tienen la capacidad para sintetizarlos excepto en algún caso (Moran & Jarvik 2010), pero los ingieren en la dieta como fuente fundamental de retinoides (incluida la vitamina A). Una dieta rica en carotenoides favorece la salud y previene la degeneración macular, algunas enfermedades cardiovasculares, y algunos tipos de cáncer (Fraser & Bramley 2004). Debido a sus propiedades colorantes, nutritivas y saludables, los carotenoides son ampliamente utilizados en la industria agroalimentaria y farmacéutica (Fraser & Bramley 2004).

En plantas, los carotenoides son los responsables del color de muchas semillas, flores y frutos. Gracias a su pigmentación, permiten la atracción de polinizadores y animales para la dispersión de semillas (Rodríguez-Concepción & Boronat 2002; Chappell 2002; Croteau et al. 2000). En las hojas, la presencia de clorofilas enmascara los colores de los carotenoides, que sólo se hacen visibles cuando éstas se degradan resultando en los colores otoñales característicos de muchos bosques de las áreas templadas del planeta (Ruiz-Sola & Rodríguez-Concepción 2012).

Pero los carotenoides son mucho más que simples pigmentos. Las funciones más relevantes a nivel biológico de los carotenoides tienen que ver con la fotosíntesis. Por un lado, actúan como pigmentos accesorios, incrementando el espectro de luz para realizar la fotosíntesis. Y por otro lado, son potentes protectores frente al exceso de luz (Ruiz-Sola & Rodríguez-Concepción 2012). En presencia de alta intensidad lumínica la energía fotoquímica absorbida por la clorofila no se transfiere adecuadamente y se generan especies reactivas de oxígeno (ROS). Los carotenoides ejercen una doble acción fotoprotectora. Por un lado, son capaces de disipar como calor la energía de las clorofilas, desactivando rápidamente su estado excitado. Y por otro lado, desactivan las especies reactivas de oxígeno que se forman cuando la irradiación excede la capacidad fotosintética de la planta. Por ejemplo, pueden actuar como quelantes del $^1\text{O}_2$ (Krieger-Liszkay 2005), o terminar las reacciones de peroxidación ocurridas en las cadenas lipídicas (Müller et al. 2001). Este papel fotoprotector es absolutamente esencial para las plantas, que son incapaces de sobrevivir en la luz sin carotenoides (Ruiz-Sola & Rodríguez-Concepción 2012).

Además, metabolitos derivados de la degradación oxidativa (enzimática o no) de los carotenoides (genéricamente denominados apocarotenoides) son capaces de actuar como moléculas señales que orquestan respuestas adaptativas de la planta con su entorno. Entre los producidos enzimáticamente se encuentran las estrigolactonas y el ácido abscísico (ABA), hormonas implicadas en el desarrollo y en la interacción con el medio (como las micorrizas o algunas plantas parásitas en el caso de las estrigolactonas y las respuestas a estrés hídrico o salino en el caso del ABA). Además, el estrés oxidativo en presencia de un exceso de luz puede generar la rotura no enzimática de algunos carotenoides. Por ejemplo, la rotura oxidativa del β -caroteno puede generar β -ciclocitral, que junto con las especies reactivas de oxígeno actúan como señales retrógradas capaces de orquestar la comunicación cloroplasto-núcleo y regular la expresión de genes nucleares relacionados con fotoprotección (Ramel et al. 2012; Singh et al. 2015; Xiao et al. 2012).

1.2 Biosíntesis de carotenoides

La biosíntesis de carotenoides tiene lugar en todo tipo de plastos. Aunque los mayores niveles de carotenoides se encuentran en cromoplastos (plastos con color especializados en la acumulación de carotenoides) y, en menor medida, en cloroplastos, también se producen carotenoides en amiloplastos (plastos especializados en la reserva de almidón), elaioplastos (plastos especializados en la reserva de lípidos), y etioplastos (plastos de plantas germinadas y crecidas en oscuridad) (Eggers & Schwudke 2016). En cloroplastos los carotenoides se acumulan en una proporción similar en todas las especies (45% de luteína, 25-30% de β -caroteno y 10-15% de las β , β -xantofilas violaxantina y neoxantina) (Britton 1993).

1.2.1 Generación de precursores (IPP y DMAPP)

Como todos los isoprenoides, los carotenoides provienen de la condensación de isopentenil difosfato (IPP) y su isómero de doble enlace dimetilalil difosfato (DMAPP) (Pulido et al. 2012). En plastos, la síntesis de estos dos precursores se lleva a cabo por la vía del metileritrol difosfato (MEP) (**Figura I.1**). La vía del MEP produce IPP y DMAPP a partir de piruvato y gliceraldehído 3-fosfato para la síntesis de isoprenoides relacionados con la fotosíntesis y fotoprotección, como carotenoides y las cadenas prenil de las clorofilas, tocoferoles, filoquinonas y plastoquinonas; hormonas como citoquininas y giberelinas; o moléculas para interactuar con el entorno como monoterpenos y diterpenos (**Figura I.1**).

La primera reacción de la ruta del MEP, catalizada por la enzima desoxixilulosa 5-fosfato (DXP) sintasa (DXS), es también el principal paso regulador del flujo metabólico de la vía (Wright et al. 2014). La siguiente etapa está catalizada por la enzima DXP

reductoisomerasa (DXR), que generará MEP a partir de DXP (Rodríguez-Concepción & Boronat 2002; Phillips et al. 2008; Zhao et al. 2013). La producción de MEP puede ser bloqueada por inhibidores específicos de la vía como clomazona (CLM), que inhibe la DXS, y fosmidomicina (FSM), que inhibe la DXR, causando un fenotipo albino y letal. El MEP se convierte posteriormente a metileritritol 2,4-ciclodifosfato (MEcPP) en tres pasos enzimáticos. Después la enzima hidroximetilbutenil difosfato (HMBPP) sintasa (HDS) convierte el MEcPP en HMBPP, que finalmente será convertido en IPP y DMAPP mediante la enzima HMBPP reductasa (HDR) (**Figura I.1**).

Fuera de los plastos, la vía del mevalonato (MVA) también produce IPP y DMAPP para la síntesis de isoprenoides citosólicos y mitocondriales (**Figura I.1**). Aunque existe un pequeño flujo de intercambio de IPP y DMAPP entre el citosol y los plastos, dicho flujo no contribuye sustancialmente a la síntesis de carotenoides en condiciones normales, aunque sí parece acelerarse en condiciones de bloqueo de una de las dos vías (Rodríguez-Concepción & Boronat 2002).

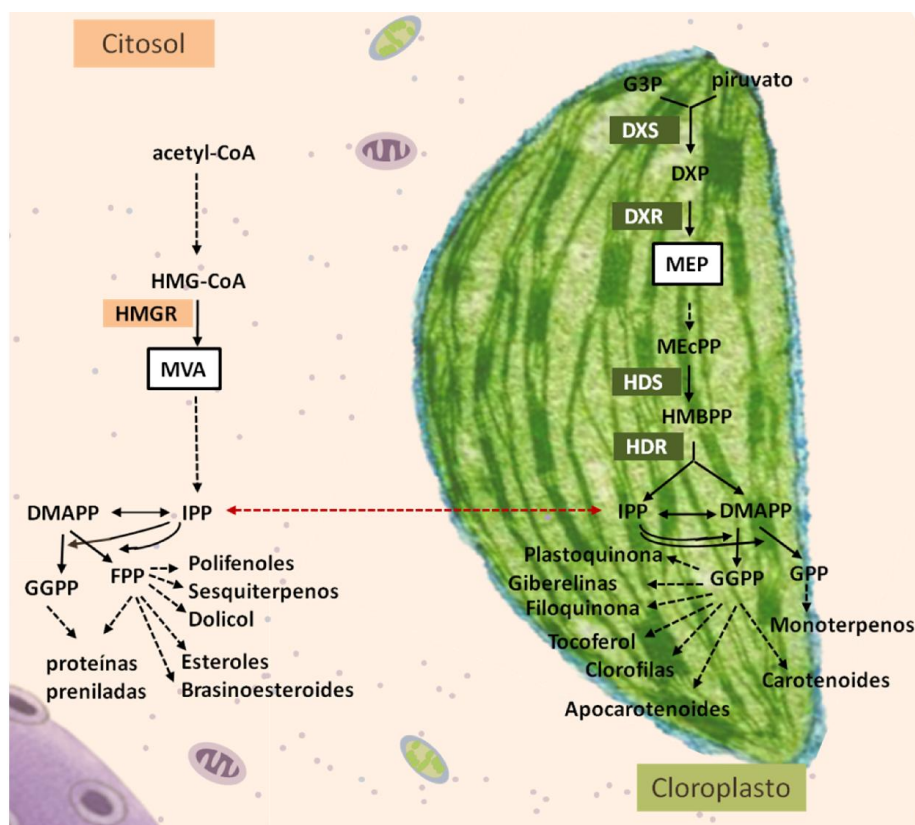


Figura I. 1 Esquema representativo de las dos vías productoras de isoprenoides en plantas.

Se ha representado los principales pasos enzimáticos de la vía del MEP y la vía del MVA (enzimas en recuadros verdes en el caso del MEP y en recuadros rosas en el caso del MVA) así como los principales productos generados. Las abreviaturas corresponden a las indicadas en el inicio de la tesis. También se ha ilustrado el intercambio de IPP y DMAPP entre ambas.

1.2.2 De IPP y DMAPP a carotenoides

La síntesis de carotenoides empieza con la adición de tres moléculas de IPP a una molécula de DMAPP para producir geranilgeranil difosfato (GGPP) gracias a la enzima GGPP sintasa. El GGPP se usa para la producción de varios grupos de isoprenoides plastídicos (**Figura I.1**). Posteriormente la condensación de dos moléculas GGPP catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY) genera fitoeno (**Figura I.2**). Este primer paso específico de la síntesis de carotenoides también es el principal paso limitante de la ruta (Fraser et al. 2002). Aun así, estudios en *Arabidopsis thaliana* y tomate (*Solanum lycopersicum*) sugieren que el carácter limitante de la actividad de PSY también depende de la disponibilidad de precursores sintetizados por la vía del MEP (Fraser et al. 2002) (**Figura I.2**).

En los siguientes pasos de la ruta biosintética, el isómero *cis*-fitoeno (el principal producto de la actividad PSY), que es incoloro, se transforma en *trans*-licopeno, con color rosado, mediante una serie de cuatro desaturaciones y dos isomerizaciones. En plantas, las cuatro desaturaciones se realizan en dos pasos catalizados por dos enzimas distintas: la fitoeno desaturasa (PDS) reduce el fitoeno a ζ -caroteno pasando por el intermediario fitoflueno, y la enzima ζ -caroteno desaturasa (ZDS) produce *cis*-licopeno vía neurosporeno. Además, también participan dos isomerasas 15-*cis*- ζ -caroteno isomerasa (ZISO) y carotenide isomerasa (CRTISO), esta última cataliza el paso final de convertir la forma *cis*-licopeno (prolicopeno) a la forma *trans*-licopeno (Isaacson et al. 2002; Park et al. 2002) (**Figura I. 2**).

El licopeno es el punto donde la vía se bifurca. La ciclación de los extremos de la molécula catalizada por licopeno ciclasas de tipo ϵ (LYCE) o β (LYCB) genera α -caroteno (con un anillo ϵ y otro β) y β -caroteno (con dos anillos β), ambos de color anaranjado. La posterior oxidación de los anillos del α -caroteno por hidroxilasas de tipo ϵ y β (LCY-E y LCY-B respectivamente) genera finalmente luteína mediante la acción de citocromo P450 monooxigenasas (CYP97A3 y CYP97C1) (Tian et al. 2004; Galpaz et al. 2006; Kim & DellaPenna 2006). La luteína es un carotenoide de color amarillo y resulta el más abundante en el tejido foliar en plantas. Por otro lado, el β -caroteno se hidroxila mediante hidroxilasas de tipo β dando lugar a la zeaxantina (Tian et al. 2004; Galpaz et al. 2006; Kim & DellaPenna 2006). Posteriormente la epoxidación de la zeaxantina mediante la zeaxantina epoxidasa (ZEP) produce violaxantina vía anteraxantina. Esta reacción puede revertirse por la violaxantina depoxidasa (VDE), dando de nuevo zeaxantina. La violaxantina se convierte en neoxantina mediante la neoxantina sintasa (NSY), siendo este el último paso de la biosíntesis de carotenoides en cloroplastos (**Figura I. 2**).

1.2.3 De carotenoides a apocarotenoides

Como se ha comentado anteriormente, los carotenoides pueden ser cortados por reacciones enzimáticas o no enzimáticas, dando lugar a los apocarotenoides. Las enzimas que catalizan las reacciones de corte pertenecen a la familia de las CCDs, de las siglas de *carotenoid cleavage dioxigenases* (Auldrige et al. 2006). Estas enzimas se encargan de cortar específicamente los dobles enlaces de los carotenoides, generando productos cuya longitud es menor y además están oxidados, por lo que son más solubles y volátiles que los carotenoides. Algunos de estos productos tienen actividad como fitohormonas (ABA o las estrigolactonas) o moléculas señal que controlan el desarrollo y las respuestas a estímulos ambientales, muchas de las cuales aún no han sido identificadas (**Figura 1.2**). En *Arabidopsis* hay nueve CCDs y entre ellas cinco pertenecen al subgrupo NCED según sus siglas en inglés *nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase* (NCED2, NCED3, NCED5, NCED6 y NCED9) y participan en la síntesis de ABA (Fraser & Bramley 2004). La síntesis del ABA se produce a partir de la violaxantina y neoxantina que son convertidas por las NCEDs en un producto de 15 carbonos llamado xantonina y un metabolito de 25 de átomos de carbono. Posteriormente la xantonina migra al citosol donde se transforma en aldehído abscísico gracias a la enzima ABA2. El paso final de la síntesis de ABA es la oxidación del aldehído abscísico por la enzima oxidasa aldéhdica (AAO3) (**FIGURA 1.2**) (Seo & Koshiba 2002). Por otra parte, para la síntesis de estrigolactonas, el β -caroteno se isomeriza a *cis*- β -caroteno y se convierte mediante las CCD7 y CCD8 en carlactona. Posteriormente la carlactona es exportada al citosol donde es convertida mediante una citocromo P450 monooxigenasa (CYP711A1) en 5-deoxistrigol (Hou & Rivers 2016; Booker, Sieberer & Wright 2005). Además, mediante reacciones no enzimáticas a partir del β -caroteno se da la producción de apocarotenoides como el β -ciclocitral o Dihidro-actinidiólido (DHA) (Hou & Rivers 2016) (**Figura 1.2**).

1.2.4 Regulación de la biosíntesis de carotenoides

La biosíntesis de carotenoides se regula en función del patrón de desarrollo de la planta pero está muy condicionadas por las condiciones ambientales de su entorno, con un papel preponderante de la luz (Ruiz-Sola & Rodríguez-Concepción 2012). La regulación por luz, que ocurre tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, se ha estudiado más detalladamente en dos sistemas modelo: la desetiolación y el SAS. En el próximo apartado se describe esta regulación en detalle.

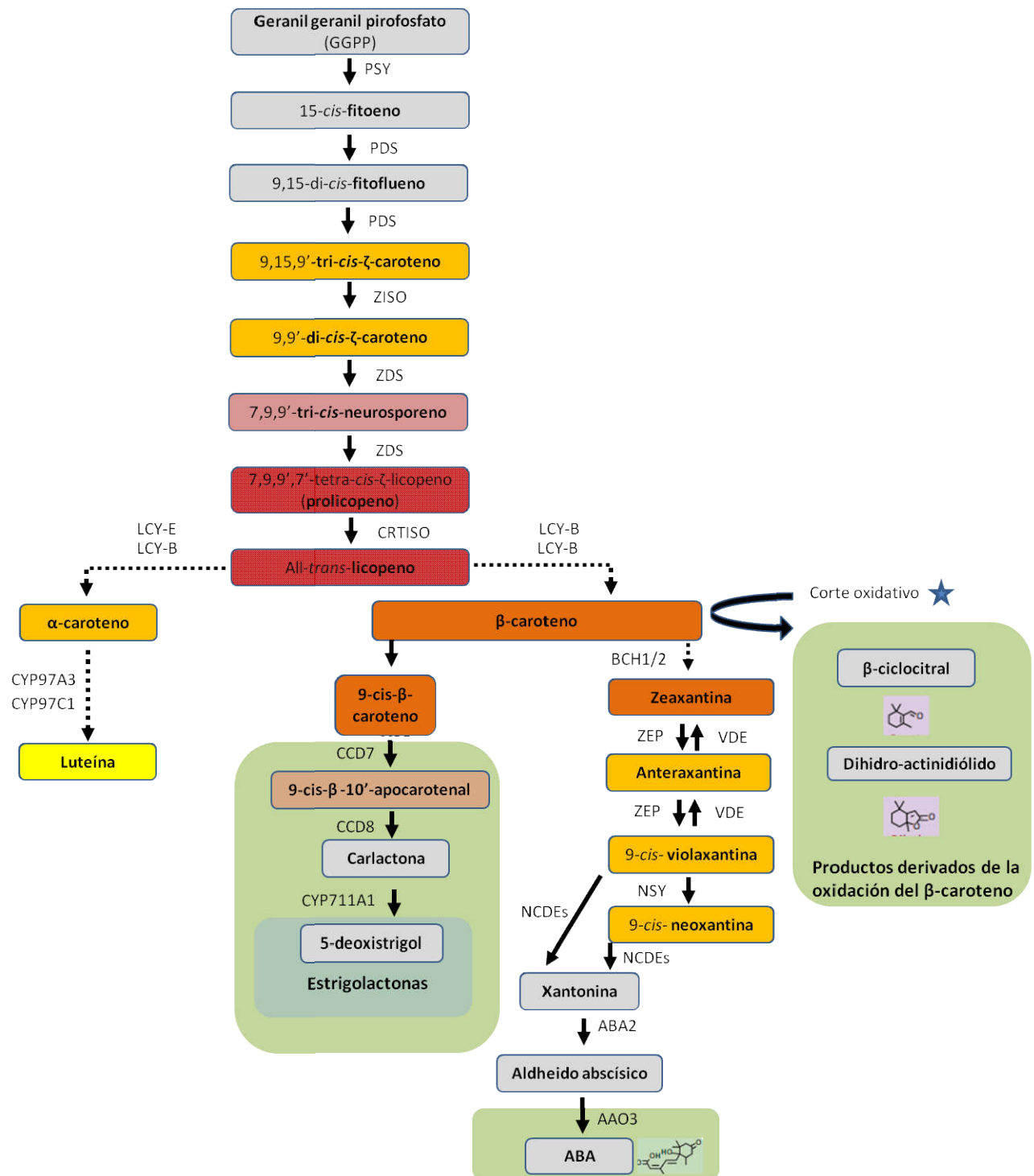


Figura I. 2 Ruta de los carotenoides y generación de apocarotenoides (ABA, productos de oxidación del β-caroteno y derivados de estrigolactonas).

Se han representado los diferentes pasos enzimáticos de la vía de los carotenoides así como los pasos para la generación de apocarotenoides. Los apocarotenoides están englobados en recuadros verdes. Las reacciones no enzimáticas se indican mediante una estrella. Las abreviaturas corresponden a las indicadas en el inicio de la tesis. Las abreviaturas se indican al inicio de la tesis. Figura adaptada a partir de (Hou & Rivers 2016; Yuan & Zhang 2015)

2. La luz como fuente de información para las plantas

Las plantas son organismos sésiles. Debido a que no pueden escapar de condiciones ambientales adversas (por ejemplo resguardándose, desplazándose, etc...), han evolucionado para readaptar su metabolismo y su programa de desarrollo en respuesta a señales de su entorno (luz, temperatura, viento, gravedad, humedad, depredadores, disponibilidad de agua y nutrientes...).

La luz actúa como fuente de energía para realizar la fotosíntesis, pero también actúa como fuente de información del entorno. Las plantas han desarrollado la capacidad de captar cambios en las condiciones de luz y como consecuencia activar una serie de respuestas fisiológicas que les permiten adaptarse maximizando su eficiencia fotosintética (por ejemplo, acumulando menos pigmentos fotosintéticos cuando otras plantas les hacen sombra o protegiéndose contra la fotooxidación cuando la intensidad de luz pasa a ser excesiva) y modificando su patrón de desarrollo (por ejemplo, alargándose o floreciendo en función de la cantidad de luz y el fotoperiodo).

2.1 Percepción: los fotorreceptores fitocromos

Tal como se ha comentado, debido a que la luz actúa como fuente de información ambiental, las plantas han desarrollado mecanismos muy sofisticados de captación de diferencias lumínicas (Folta & Childers 2008). Los cambios de calidad de la luz, de intensidad o de fotoperiodo son percibidas gracias a los fotorreceptores.

Los fotorreceptores son proteínas fotosensibles capaces de transformar señales lumínicas en respuestas bioquímicas y moleculares, induciendo así una respuesta adaptativa (como en el caso del SAS). Se conocen cinco tipos de fotorreceptores en *Arabidopsis*, que absorben diferentes regiones del espectro de luz: el receptor UVR8, (que absorbe luz UV-B (280-315 nm)); las fototropinas (phot), los criptocromos (cry), las zeitlupes (ZTL) (que absorben luz UV-A (~320- 400 nm) y azul (~400- 500 nm)); y los fitocromos (phy) (que absorben en el rango del rojo (R) (~666 nm) y rojo lejano (FR) (~730 nm)) (**Figura I.3**).

Hay una nomenclatura estandarizada en el campo del estudio de los fitocromos que utilizaré en esta tesis. Se utilizará mayúsculas cursiva para referir a los genes WT (ejemplo: *PHYA*), minúscula cursiva para los mutantes (ejemplo: *phyA*) y minúscula sin cursiva para la holoproteína (que es el fitocromo maduro junto al cromóforo; ejemplo: phyA) (Quail 1994).

Los fitocromos son una familia de fotorreceptores compuesta de cinco miembros en *Arabidopsis thaliana* (*PHYA* a *PHYE*) que presentan una actividad diferencial en

presencia de luz R y FR. La luz R es la óptima para realizar la fotosíntesis, mientras que la luz FR no es fotosintéticamente activa. Por esta razón, los fitocromos son de gran importancia ya que permiten a la planta detectar cambios en la capacidad fotosintética de la luz incidente e inducir así respuestas a cambios energéticos, como ocurre durante el SAS, además de regular respuestas de desarrollo como la desetiolación, la germinación o la floración (**Figura I.3**).

Los fitocromos son proteínas homodiméricas con un dominio N-terminal, que se une a un cromóforo bilina, y un dominio C-terminal, que les confiere la capacidad de dimerizar y que posee la secuencia de localización nuclear (NLS). Los fitocromos se clasifican como fotolábiles (*PHYA*) o fotoestables (*PHYB*, *PHYC*, *PHYD*, *PHYE*) en función de la estabilidad que presenten en luz. Los fitocromos tienen dos formas fotoconvertibles que son reversibles. Se sintetizan en la forma inactiva Pr (λ_{max} 666nm). En oscuridad los fitocromos se localizan en el citoplasma; después de la percepción de luz R, rápidamente, la forma Pr se convierte en la forma activa Pfr (λ_{max} 730nm) y se transloca al núcleo induciendo la expresión de genes de respuesta primaria a fitocromos, que inducirán cascadas de transducción del señal (**Figura I.4**). Cuando la planta pasa a luz FR (o aumenta la proporción de luz FR), la forma activa Pfr pasa a la forma inactiva Pr.

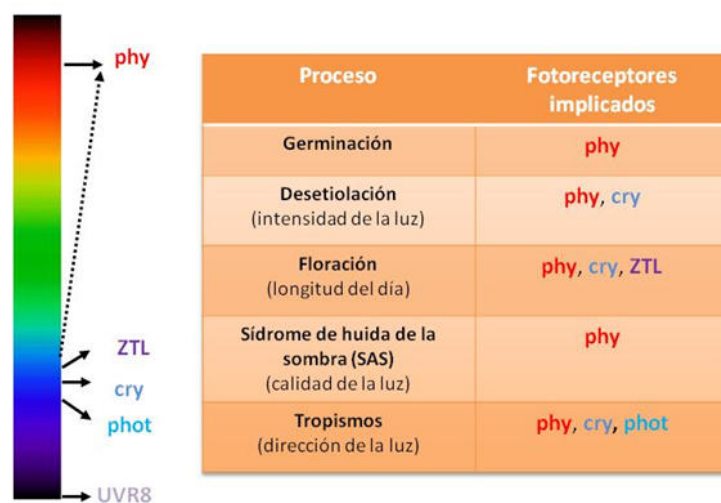


Figura I.3 Fotorreceptores y su participación en respuestas fisiológicas en *Arabidopsis thaliana*.

Longitudes de onda del espectro de luz reconocidas por cada fotoreceptor. Se representan los fitocromos (phy), las zeilupes (ZTL), los criptocromos (cry), las fototropinas (phot), y el receptor de ultravioleta (UVR8).

El phyB es el principal fitocromo regulador de múltiples respuestas en la planta: germinación, desetiolación, floración, SAS, elongación del hipocotilo, gravitropismo, crecimiento de los pelos radiculares, regulación de la arquitectura de la hoja, elongación de internodos, apertura estomas, reloj circadiano (Franklin & Quail 2010).

El phyA también tiene un papel importante en la elongación del hipocotilo durante la desetiolación: mientras que el phyB reprime esta respuesta en presencia de luz R, el phyA la reprime en respuesta a luz FR (Franklin & Quail 2010). phyD y phyE, y en algunos casos phyC, tienen funciones redundantes al phyB en estas u otras respuestas (Monte et al. 2003).

2.2 Transducción: el modelo de desetiolación

Se llama transducción de la señal lumínica a toda la serie de eventos moleculares ocurridos entre la percepción de la luz y la inducción de cambios en la expresión génica que desembocan finalmente en la generación de una respuesta fisiológica en la planta. Algunos fotorreceptores, como los fitocromos, se dirigen al núcleo al fotoactivarse, y de esta forma son capaces de interactuar rápidamente con componentes nucleares o factores de transcripción e inducir cambios directos en la expresión génica. La mayor parte de estos componentes se ha identificado estudiando el proceso de desetiolación, un proceso de desarrollo regulado por la luz que se entiende particularmente bien a nivel molecular (Quail 2002). Cuando las semillas germinan en la oscuridad, las plántulas resultantes se desarrollan siguiendo un programa denominado etiolación o escotomorfogénesis, que se caracteriza por (1) un alargamiento activo del hipocotilo para buscar la luz, (2) la presencia de cotiledones sin exponer, cerrados y formando parte del gancho apical que protege el meristemo apical cuando la plántula crece a través del suelo, y (3) el desarrollo de etioplastos con precursores de la clorofila y bajos niveles de carotenoides. Cuando las plántulas etioladas emergen del suelo y perciben la luz, se inicia un proceso de desarrollo distinto denominado desetiolación o fotomorfogénesis. La desetiolación resulta en (1') la inhibición de la elongación del hipocotilo, (2') la expansión de los cotiledones, y (3') la diferenciación de los etioplastos en cloroplastos.

Un componente específico de la respuesta de los fitocromos son los PIFs (PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS). Se trata de una familia de factores de transcripción de tipo bHLH, muchos de los cuales son capaces de interactuar con fitocromos fotoactivados en el núcleo. Esta interacción provoca la fosforilación de los PIFs por mecanismos no del todo establecidos. La fosforilación de algunos PIFs (PIF1, PIF3, PIF4 y PIF5, también conocidos como el cuarteto PIF o PIFq) provoca su eventual degradación por el proteosoma, mientras que en el caso de PIF7 debilita la unión a sus promotores diana sin alterar los niveles de proteína total (Leivar et al. 2008b; Castillon et al. 2007). PIF1 y PIF3 son capaces de interactuar con phyA y phyB, mientras que PIF4, PIF5 y PIF7 solo interactúan con phyB (Leivar et al. 2008b). Además PIF3, PIF4 y PIF7 son capaces de afectar negativamente a la actividad del propio phyB en presencia de luz R continua, promoviendo niveles menores de proteína phyB de forma aditiva o sinérgica enviándolo a degradar vía proteasoma (Leivar et al. 2008b). En general, los

PIFs se acumulan (o se activan) en oscuridad o en sombra para reprimir los procesos asociados con la fotomorfogénesis y promueven el alargamiento del hipocotilo.

Junto con los PIFs, dos de los componentes principales de las rutas de transducción lumínica son *HY5* (*LONG HYPOCOTYL5*) y *COP1* (*CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1*), su antagonista. *HY5* es un factor de transcripción bZIP que se acumula en luz para promover el desarrollo fotosintético durante la desetiología. Además *HY5* participa como integrador de la información lumínica con otras vías como la respuesta a hormonas como estrigolactonas y ABA y señales retrógradas (Oyama et al. 1997; Song et al. 2008; Ruckle & Larkin 2009; Larkin & Ruckle 2008; Jia et al. 2014; Chen et al. 2013). A su vez, *HY5* es degradado en oscuridad por interacción con *COP1*, una E3 ubiquitin ligasa que lo marca para llevarlo al proteasoma evitando así la fotomorfogénesis (Ang et al. 1998; Hardtke et al. 2000; Zhang et al. 2011; Wang 2001) (**Figura I.4**). En la luz, *COP1* se transporta fuera del núcleo en un proceso dependiente de criptocromos y regulado también por los fitocromos. Así se previene la degradación de *HY5*. Niveles aumentados de *HY5* y reducidos de PIFs acaban desreprimiendo la fotomorfogénesis de forma sinérgica (Leivar & Quail 2011; Castillon et al. 2007).

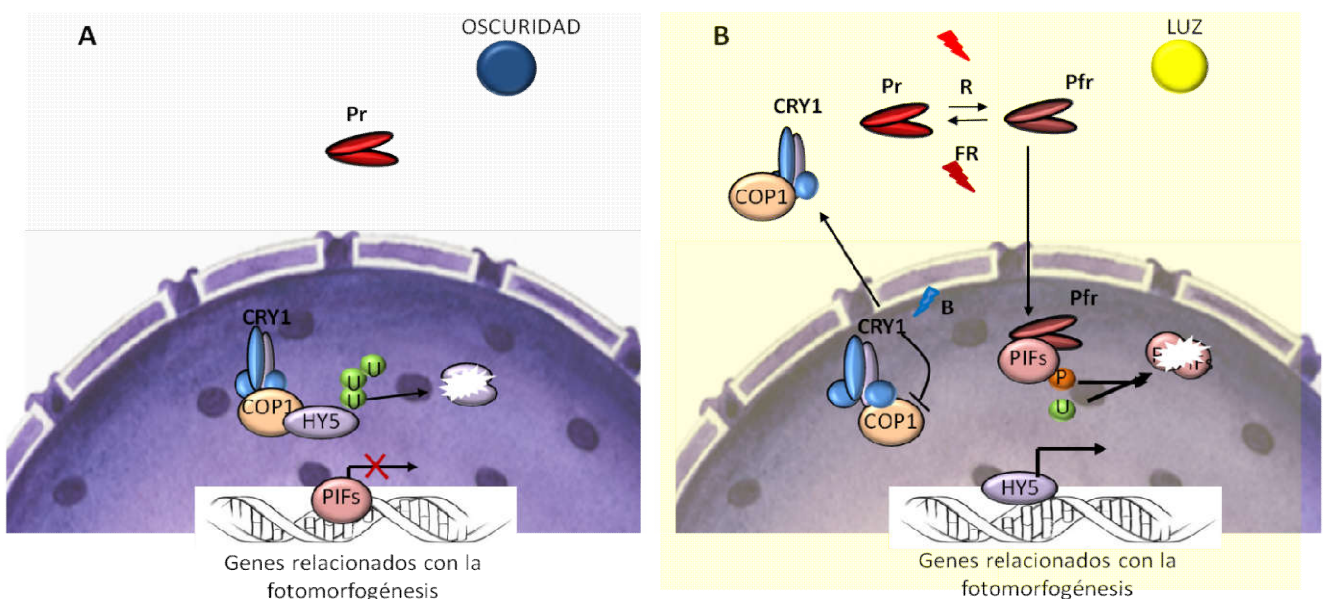


Figura I.4 Componentes de la transducción de la señal lumínica de los fitocromos y criptocromos.

A) En oscuridad los fitocromos se encuentran en su forma inactiva Pr. *COP1* se acumula en el núcleo y ubiquitina a *HY5* para enviarlo a degradar vía proteasoma. De esta forma los PIFs pueden unirse al ADN y reprimir genes que activan la fotomorfogénesis. B) En presencia de luz, el fotoequilibrio de los fitocromos se desplaza hacia la forma activa Pfr, capaz de migrar al núcleo y interactuar con los PIFs, enviándolos a degradar vía proteasoma. Por otra parte, *COP1* se transporta fuera del núcleo vía criptocromo1 (*cry1*), impidiendo la degradación de *HY5* y por tanto permitiendo la unión de *HY5* al ADN y la inducción de la expresión de genes activadores de la fotomorfogénesis. Las abreviaturas correspondientes se encuentran al inicio de la tesis.

2.3 Regulación de la síntesis de carotenoides durante la desetiolación

Muchos estudios realizados sobre la regulación de la carotenogénesis en *Arabidopsis* se han focalizado en la desetiolación, ya que este proceso implica una gran activación de la producción de carotenoides en cloroplastos para proteger el aparato fotosintético y ayudar al desarrollo fotosintético. Todos los genes de *Arabidopsis* que codifican enzimas de la ruta del MEP y de la biosíntesis de carotenoides se inducen coordinadamente (Rodríguez-Concepción 2006; Meier et al. 2011). Con tal de facilitar la transición hacia un metabolismo fotosintético y minimizar los efectos dañinos de la luz cuando el aparato fotosintético se está ensamblando durante la desetiolación, la producción de carotenoides también está coordinada con la producción de clorofilas mediante mecanismos moleculares que dependen de la familia de fotorreceptores fitocromos (Von Litz et al. 1997; Woitsch & Ro 2003; Toledo-Ortiz et al. 2010; Meier et al. 2011). En concreto, se ha descrito un papel preponderante para los PIFs (Leivar et al. 2008a; Leivar & Quail 2011). Los PIFs se acumulan en oscuridad e inhiben el desarrollo fotosintético debido a que se unen a los promotores de genes relacionados con la fotosíntesis impidiendo el acceso de otros factores de transcripción encargados de activar estos genes, como HY5 (**Figura 1.4A**) (Castillon et al. 2007; Bae Gabyong & Choi 2008; Leivar & Quail 2011). Se ha observado que los mutantes deficientes en PIFs tienen unos mayores niveles de clorofilas y carotenoides (Toledo-Ortiz et al. 2010; Leivar et al. 2009). En ellos, PIF1 se ha determinado como el mayor regulador de la síntesis de carotenoides durante la desetiolación, siendo capaz de unirse a un motivo G-Box (CACGTG) en el promotor de *PSY* para inhibir su transcripción (Toledo-Ortiz et al. 2010). Se ha demostrado que la sobreexpresión de *PSY* es suficiente para el incremento de la síntesis de carotenoides durante la desetiolación (Rodríguez-Villalón et al. 2009b; Rodríguez-Villalón et al. 2009a) y que además este incremento genera una inducción en la expresión de *DXS* posiblemente para asegurar el suministro de precursores (Rodríguez-Villalón et al. 2009a).

Posteriormente trabajos han demostrado que la actividad represora de los PIFs (y, específicamente, de PIF1) sobre la expresión de *PSY* y la síntesis de carotenoides está antagonizada por HY5, que de esta forma actúan como un módulo regulador que coordina la expresión genética relacionada con la fotosíntesis y con la temperatura (Toledo-Ortiz et al. 2014). HY5 es un inductor de las respuestas relacionadas con la fotomorfogénesis, incluyendo la acumulación de clorofilas y carotenoides (Oyama et al. 1997). En concordancia con el rol de HY5 como activador de la fotomorfogénesis y de una mayor acumulación de pigmentos, el mutante *hy5* presenta una menor cantidad de transcritos de *PSY*, tanto en luz R como en oscuridad (Toledo-Ortiz et al. 2014). Además mediante inmunoprecipitación de cromatina se determinó que HY5 es capaz de unirse al mismo motivo G-box que PIF1, confirmando el papel antagonista

entre PIF1 y HY5 en la regulación de la biosíntesis de carotenoides (Toledo-Ortiz et al. 2014). HY5 regula la expresión génica directamente, uniéndose a motivos “ACE” (motivos que contienen ACGT) como la Z-box (ATACGTGT), C-box (GACGTC), G-box y cajas híbridas C/G (GACGTG) y C/A (GACGTA) (Lee & He 2007). Se desconoce la relevancia de este tándem antagonista PIF1-HY5 para la regulación de la síntesis de carotenoides en otros procesos regulados por luz además de la desetiolación.

2.4 Síndrome de huida de la sombra (SAS):

Los fitocromos son los principales fotorreceptores implicados en el SAS, una respuesta adaptativa que permite a la planta detectar la presencia de plantas vecinas potencialmente competidoras por la luz, así como crecer y desarrollarse en ambientes con baja intensidad de luz por la elevada densidad vegetal, tal y como sucede en la naturaleza (por ejemplo en selvas o bosques) o en la agricultura (cultivos extensivos).

La presencia de un dosel vegetal o de vegetación próxima resulta en una reducción del ratio R:FR (R/FR) percibido por parte de la planta. Concretamente, bajo un dosel vegetal el R es filtrado por las hojas de la vegetación situada por encima, resultando en una disminución del R/FR percibido por la planta, además de ir acompañado de una disminución en la intensidad lumínica. En el caso de la proximidad de vegetación que no llega a ensombrecer (por ejemplo, vegetación situada al lado de la planta de estudio), el R/FR disminuye debido a un incremento del FR reflejado por estas plantas vecinas, y en este caso, no va acompañado de una disminución en la intensidad lumínica. Esta reducción en el R/FR es percibida principalmente por el phyB (Holmes & Smith 1977; Yanovsky, Casal & Whitelam 1995; Smith 2000; Martínez-García et al. 2014). Por otra parte, la sombra producida por un dosel vegetal permite la acumulación del phyA por lo que también implica la percepción de R/FRbajo tanto por phyA como por phyB (Holmes & Smith 1977; Yanovsky, Casal & Whitelam 1995; Smith 2000; Sellaro et al. 2010), la reducción de la luz azul percibida por cry1 (Yanovsky, Casal & Whitelam, 1995) y la reducción del ratio azul/verde también percibido por cry1 (Sellaro et al. 2010).

En esta tesis nos centraremos en las respuestas del SAS causadas por una reducción de R/FR. La reducción de R/FR causada por el reflejo o filtración foliar de la luz solar produce cambios en el fotoequilibrio de los fitocromos hacia la forma inactiva, induciendo el SAS (Ballaré et al. 1987). El SAS incluye respuestas como la inhibición de la germinación, la inducción de la elongación del hipocotilo de las plántulas, los internodos del tallo, y los peciolo de las hojas, la inhibición de la expansión foliar, y la inducción del tiempo de floración. En cuanto a la respuesta molecular, la señal percibida por phyB y, en menor medida, otros fitocromos (Bae Gabyong & Choi 2008) desencadena cambios en la expresión génica de reguladores positivos y negativos del

SAS que actúan como un sistema de “acelerador y freno” que ayuda a controlar la magnitud de la respuesta a sombra (Roig-Villanova et al. 2007; Sessa et al. 2005).

La disminución de R/FR induce la transcripción de genes de respuesta rápida que actúan como represores del SAS, como *PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED1* (*PAR1*), su parólogo *PAR2* (Bou-Torrent et al. 2008), y *LONG HYPOCOTYL IN FAR RED1* (*HFR1*). Se tratan de co-factores transcripcionales, ya que son proteínas sin dominio de unión a ADN pero capaces de interaccionar con factores de transcripción reales, impidiendo así su unión al ADN (Galstyan et al. 2012; Galstyan et al. 2011; Hornitschek et al. 2009). Los PIFs actúan de reguladores positivos de varias de las respuestas del SAS (Lorrain et al. 2008; Leivar et al. 2012b; Hornitschek et al. 2012; Li et al. 2012). En este caso los niveles de proteína de varios PIFs incrementan de forma rápida en condiciones de bajo ratio R/FR (Lorrain et al. 2008; Leivar et al. 2012b). Los PIFs inducen la respuesta de elongación del hipocotilo. Así en respuesta a sombra de elongación de hipocotilo está significativamente atenuada en mutantes *pifq* (*pif1 pif3, pif4, pif5*) y *pif7* (Lorrain et al. 2008; Leivar et al. 2012b; Li et al. 2012). Además las líneas sobreexpresoras de PIF4 y PIF5 tienen constitutivamente elongados los hipocotilos y los peciolos (Lorrain et al. 2008). *PAR1* y *HFR1* pueden interaccionar con varios de estos PIFs y de esta manera inhibir su unión a sus promotores diana (Hornitschek et al. 2009; Hao et al. 2012; Shi et al. 2013). Es decir, *PAR1* y *HFR1* serían antagonistas de los PIFs en la respuesta a sombra, de forma similar a lo que ocurre con *HY5* en el proceso de desetiolación.

Todas las hormonas de plantas que están implicadas en el crecimiento como auxinas, brasinoesteroides (BRs), etileno y giberelinas (GAs), participan en la respuesta a sombra durante el SAS. Por esta razón hay una coordinación de las rutas de señalización del SAS con las rutas hormonales (Martínez-García et al. 2010). Así, se ha reportado que PIF4 y PIF5 interaccionan físicamente con el promotor del gen *YUCCA8* (*YUC8*), que codifica para una enzima limitadora de flujo en la ruta de síntesis de auxinas (Hornitschek et al. 2012). También PIF7 se une a secuencias diana en los promotores de genes de biosíntesis de auxinas (*YUC5*, *YUC8* y *YUC9*). Además, PIF4, PIF5 y PIF7 coordinan la cantidad de la auxina ácido indolacético (IAA) requerido para la elongación del hipocotilo en sombra (Li et al. 2012).

Aunque el SAS constituye una respuesta esencial para la adaptación de la planta a su ambiente y tiene una clara repercusión agronómica, aun se desconocen la mayor parte de los mecanismos moleculares de su regulación. Por ejemplo, diversos estudios sugieren que *HY5* podría actuar como represor de la elongación del hipocotilo durante el SAS (Ciolfi et al. 2013; Sellaro et al. 2011), tal y como ocurre durante la desetiolación (Lau & Deng 2010). Sin embargo, las pruebas experimentales que apoyan esta posibilidad son aún débiles.

2.5 Regulación de la síntesis de carotenoides durante el SAS

Para evitar la fotooxidación tras una exposición solar intensa, las plantas necesitan producir carotenoides, ya que estos metabolitos se encargan de disipar la energía sobrante como calor y de neutralizar los radicales libres de oxígeno (Niyogi 1999). Sin embargo, cuando la planta detecta señales de sombra se produce un proceso inverso de reducción en los niveles de carotenoides, que pasan a ser menos necesarios para la fotoprotección (Roig-Villanova et al. 2007). Tal y como se ha explicado anteriormente, la regulación de la biosíntesis de carotenoides durante la desetiolación está regulada por el módulo de activación-represión PIF1-HY5, que controla la expresión de *PSY* de forma antagonista (Toledo-Ortiz et al. 2014). Este rol antagonista entre reguladores positivos y negativos es común encontrarlo en la regulación de otras respuestas fisiológicas que comprenden el SAS, como la elongación del hipocotilo (Roig-Villanova et al. 2007; Lorrain et al. 2008; Hornitschek et al. 2012; Leivar et al. 2012b; Li et al. 2012; Sellaro et al. 2012; Bou-Torrent et al. 2008; Hornitschek et al. 2009; Hao et al. 2012; Shi et al. 2013). Aun se desconoce el papel de los PIFs y HY5 en la regulación de la biosíntesis de carotenoides y particularmente en la expresión de *PSY* en respuesta a proximidad vegetal. Resultados previos mostraron que plantas sobreexpresoras de *PAR1* acumulaban mayor cantidad de carotenoides y clorofilas (Roig-Villanova et al. 2007). Sin embargo se desconoce si el módulo regulador de la respuesta de elongación del hipocotilo en sombra protagonizado por *PAR1* y *HFR1* junto a los PIFs también está implicado en la regulación de la biosíntesis de carotenoides durante el SAS.

3. Las señales retrógradas: el lenguaje de los cloroplastos

Tal y como describió Lynn Margullis en la teoría endosimbiótica, los cloroplastos y las mitocondrias provienen de ancestros bacterianos que vivían libremente. Estudios filogenéticos, bioquímicos y análisis estructurales sugieren que las mitocondrias descienden de un ancestro similar a una proteobacteria que se introdujo dentro de una arqueobacteria hace 1.5 mil millones de años, mientras que los cloroplastos descienden de un ancestro similar a una cianobacteria que invadió una célula eucariota poseedora ya de mitocondrias hace 1.5- 1.2 mil millones de años (Woodson et al. 2013). A lo largo de la evolución, estos orgánulos han derivado al núcleo la mayoría de los genes inicialmente presentes en su genoma, transformando al núcleo en su regulador principal (Timmis et al. 2004). El genoma actual de los cloroplastos (plastoma) contiene menos de 100 ORFs (Green 2011). El resto de proteínas que se encuentran en el cloroplasto (3500-4000) se transcriben desde los genes nucleares, son producidas en el citosol, y son importadas posteriormente al cloroplasto. Los genes que están relacionados con la fotosíntesis y se encuentran en el núcleo son llamados PhANGs (*Photosynthetic Associated Nuclear Genes*). Varios complejos enzimáticos de la fotosíntesis están formados por proteínas codificadas por PhANGs y

por genes del plastoma, y por lo tanto se encuentran codificados en genomas separados (Nott et al. 2006). Esto requiere que existan mecanismos que aseguren una correcta coordinación entre la expresión de ambos genomas, con tal de mantener un equilibrio en la concentración de proteínas dentro del cloroplasto y así preservar su correcto funcionamiento. La coordinación del genoma del orgánulo con el genoma nuclear implica señalización en dos direcciones: del núcleo al cloroplasto (llamada señalización anterógrada) y del cloroplasto al núcleo (señalización retrógrada).

El núcleo controla la mayoría de procesos que ocurren en el cloroplasto, incluyendo la expresión de genes de estos orgánulos mediante señalización anterógrada. Y señales retrógradas que provienen del cloroplasto son capaces de informar de su estado y modulan así la expresión de genes nucleares (Woodson & Chory 2008). Aunque las señales retrógradas varían en naturaleza y procedencia, se han agrupado en dos grupos fundamentales. Aquellas que participan en la biogénesis del cloroplasto y sus fotosistemas (y por tanto en su desarrollo), y las señales operacionales, que son aquellas que se generan específicamente en respuesta a cambios ambientales como el estado redox del cloroplasto (Pogson et al. 2008) (**Figura I.5**).

La señalización retrógrada juega un rol muy importante en respuestas adaptativas a estrés, como estrés oxidativo por exceso de luz. En estas situaciones, los cloroplastos son capaces de actuar como sensores de estrés ambiental y de enviar señales retrógradas de diferente naturaleza y procedencia para informar al núcleo de su estado y permitir la adaptación de la planta (Singh et al. 2015). Estas señales se encargan normalmente de reprimir la expresión de genes PhANGs implicados en la maquinaria fotosintética y de activar la expresión de genes relacionados con fotoprotección o resistencia a patógenos (Kleine et al. 2013).

El estudio de la señalización retrógrada en el laboratorio implica normalmente su inducción gracias al tratamiento con herbicidas como norflurazon (NFZ), un inhibidor de la síntesis de carotenoides, o lincomicina (LIN), un inhibidor de la expresión de plastoma (Singh et al. 2015; McCormac & Terry 2004). Aunque ambos tipos de inhibidores son capaces de arrestar el desarrollo de los cloroplastos, las cascadas de señalización que desatan son distintas (Voigt et al. 2010).

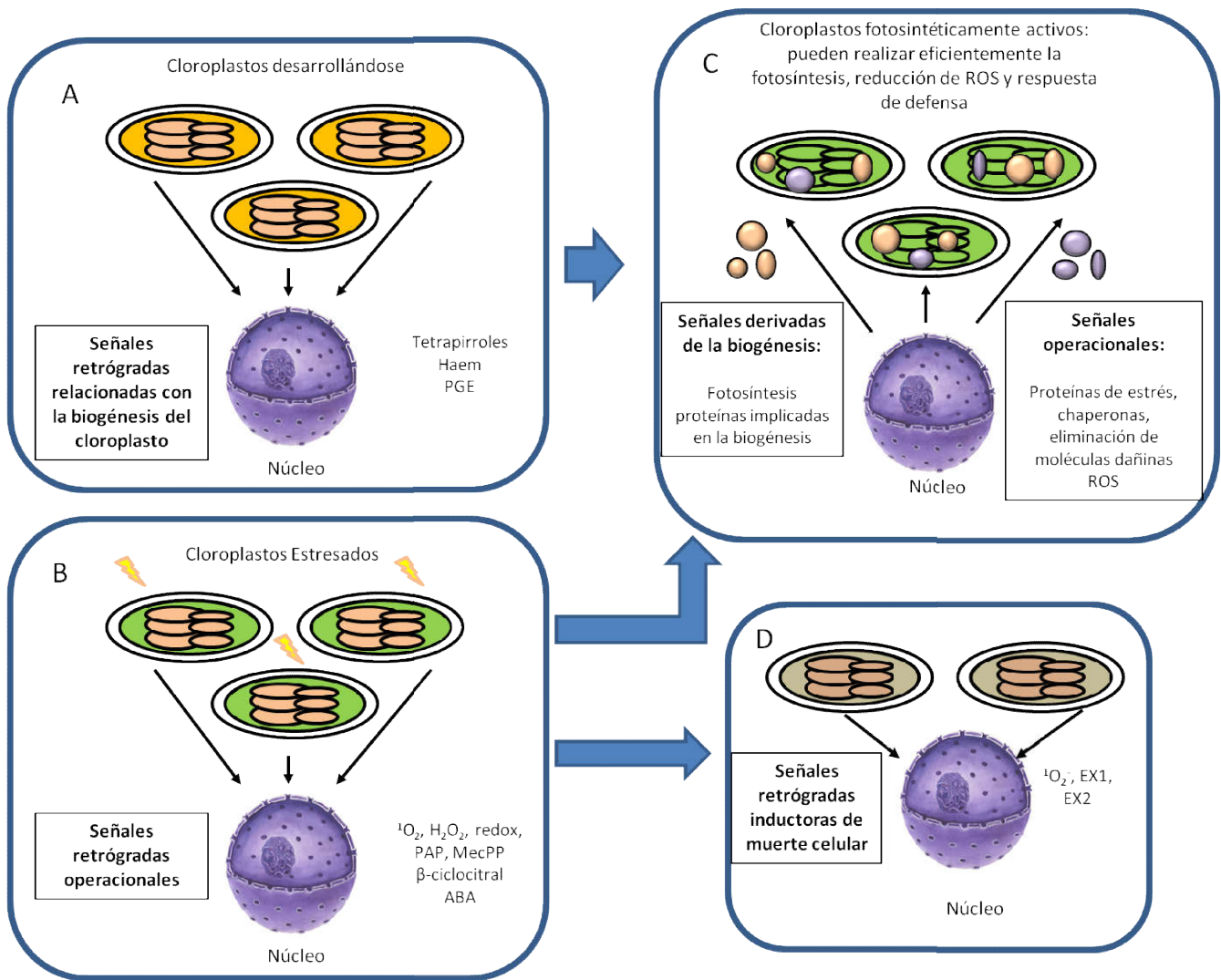


Figura I.5 Tipos de señales retrógradas generadas por los plastos (entre ellos, los cloroplastos) para controlar la transcripción de genes nucleares.

A) Señales retrógradas derivadas de la biogénesis del cloroplasto. Estas señales son generadas por los cloroplastos para coordinar la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis durante el desarrollo del cloroplasto. Estas señales permiten sincronizar la biogénesis del cloroplasto con la fotomorfogénesis en los primeros estadios de desarrollo de la planta. B) Señales retrógradas operacionales. Estas señales son utilizadas por los cloroplastos fotosintéticamente activos para regular la fotosíntesis y genes relacionados con estrés codificados en el núcleo generalmente durante estrés abiótico. Actúan como señal moléculas derivadas del $^1\text{O}_2^-$, H_2O_2 , PAP (3'-fosfoadenosina 5'- fosfato), MEcPP, β -ciclocitral o ABA. C) Señales anterógradas. Estas señales se inducen como consecuencia de las anteriores (A y B) y actúan de forma conjunta para maximizar la eficiencia fotosintética y minimizar la producción de moléculas ROS. D) Cuando el ROS induce daño severo, el cloroplasto es capaz de generar señales retrógradas que inducen la muerte celular. En este caso actúan las proteínas plastídicas EX1, EX2 (EXECUTER 1 o 2) o moléculas derivadas de $^1\text{O}_2^-$.

3.1 Señales retrógradas y biogénesis del cloroplasto.

Las señales retrógradas derivadas de la biogénesis del cloroplasto, coordinan la expresión de los genes PhANGs con el estado del cloroplasto. Estas señales están relacionadas con la regulación del ensamblaje y el mantenimiento de los componentes del sistema fotosintético necesarios para el desarrollo y funcionamiento del cloroplasto (Chan et al. 2016). Experimentos con NFZ llevaron a la identificación de los mutantes *gun* de las siglas en inglés *genome uncoupled* y demostraron la importancia de las señales derivadas de la ruta de las clorofilas o de los tetrapirroles en este proceso. Por otra parte, experimentos con LIN o cloramfenicol (CAP, otro inhibidor de la expresión del plasmoma) identificaron componentes de la señalización retrógrada asociada a la expresión del genoma del cloroplasto de las siglas en inglés *plastid gene expression* (PGE).

3.1.1 Señales retrógradas dependientes de tetrapirroles

Los genes *GUN* actúan como hilo comunicador entre el cloroplasto y el núcleo. Cuando se mutan, el cloroplasto ve impedida la comunicación retrógrada con el núcleo en condiciones de estrés, de forma que se desacoplan los dos genomas. Los genes *GUN* se detectaron mediante la búsqueda de mutantes capaces de restaurar la expresión de genes fotosintéticos nucleares (PhANGs) en presencia de NFZ. La identificación de estos mutantes *gun* demostró por primera vez que las señales plastídicas se pueden modular genéticamente y que por tanto la señal retrógrada era una ruta de señalización real del cloroplasto. La mayoría de los genes *GUN* (*GUN2*, *GUN3*, *GUN4*, *GUN5* y *GUN6*) (Susek et al. 1993) (**Figura I.6**) están implicados en la regulación del metabolismo de los tetrapirroles, algunos de cuyos productos intermediarios se han propuesto como señales retrógradas; mientras que el gen *GUN1* también controla la PGE (Singh et al. 2015). Los genes *GUN* contribuyen a la biogénesis del cloroplasto, al control del reloj circadiano, a la tolerancia al estrés, a la señalización de luz y al desarrollo de la planta (Larkin 2014).

La mayor parte de los mutantes *gun* tienen defectos en la síntesis de tetrapirroles (Zhang et al. 2011). La ruta de los tetrapirroles engloba la síntesis de la clorofila, la fitocromobilina, y el hemo (**Figura I.6**). Dos candidatos propuestos como señales retrógradas en esta vía son la Mg-Proto-IX y el hemo (Woodson et al. 2011). Estos intermediarios, que previenen la acumulación de moléculas dañinas para la planta y afectan a la expresión de PhANGs, están asociados con la regulación de genes que codifican proteínas de la fotosíntesis, enzimas del ciclo de Calvin y la síntesis de tetrapirroles (Singh et al. 2015). Las plantas tratadas con NFZ presentan una mayor cantidad de Proto-IX, lo que genera a su vez una acumulación de hemo y hasta 15 veces más de Mg-Proto-IX. En condiciones de estrés, la inducción en los niveles de Mg-Proto-IX en el cloroplasto genera un mayor exporte de Mg-Proto-IX al citosol, lo que ha

llevado a sugerir que este metabolito sea la señal negativa que inhibe la expresión de los PhANGs (Mochizuki et al. 2008; Strand et al. 2003; Ankele et al. 2007). La síntesis de Mg-Proto-IX a partir de Proto-IX depende de la actividad de los genes *GUN5* y *GUN4*, que codifican para una subunidad de la quelatasa de magnesio (ChlH) y un cofactor de ésta, respectivamente (Mochizuki et al. 2001).

La evidencia de Mg-Proto-IX como señal retrógrada incluye: a) que 70 de los 182 genes regulados negativamente en presencia de NFZ, no se encuentran reprimidos en *gun5*, b) que en presencia de NFZ se da una acumulación de Mg-Proto-IX y c) que la presencia de Mg-Proto-IX suprime la expresión de los PhANGs (Strand et al. 2003; Kindgren et al. 2012b; Ankele et al. 2007). Sin embargo, el rol de Mg-Proto-IX ha sido debatido debido a que otros estudios muestran una falta de correlación entre el metabolito y la expresión de PhANGs (Mochizuki et al. 2008; Schlicke et al. 2014). También se ha postulado que la acumulación de Mg-Proto-IX se da de manera transitoria y que por ello se ha observado esta variabilidad en la expresión de PhANGs (Kindgren et al. 2012b). El mecanismo por el cual el Mg-Proto-IX es exportado también queda por resolverse (Kleine & Leister 2016).

Los genes *GUN2*, *GUN3* y *GUN6* están implicados en la biosíntesis y metabolismo de hemo (**Figura I.6**). Mientras que *GUN6* (*FERROCHETALASE 1* (FC1)) está directamente implicado en la generación de hemo a partir de Proto-IX, *GUN2* (*HAEM OXIGENASE*) y *GUN3* (*PHYTOCHROMOBILIN SYNTHASE*) son alélicos a *LONG HYPOCOTYL 1* y *2* (*HY1* y *HY2*), implicados en la transformación del hemo en biliverdina IX (*GUN2/HY1*) y de esta en fitocromobilina, el cromóforo de los fitocromos (*GUN3/HY2*). La acumulación de hemo producido en *gun2* y *gun3* hace disminuir la cantidad de Mg-Proto-IX, indicando un feed-back negativo entre ambos compuestos (Zhang et al. 2011). Por otro lado, la presencia de hemo también se ha propuesto como una señal retrógrada, ya que el mutante de ganancia de función *gun6-1D*, que tiene mayores niveles de hemo, presenta una mayor expresión de PhANGs respecto al silvestre en presencia de NFZ (Woodson et al. 2011).

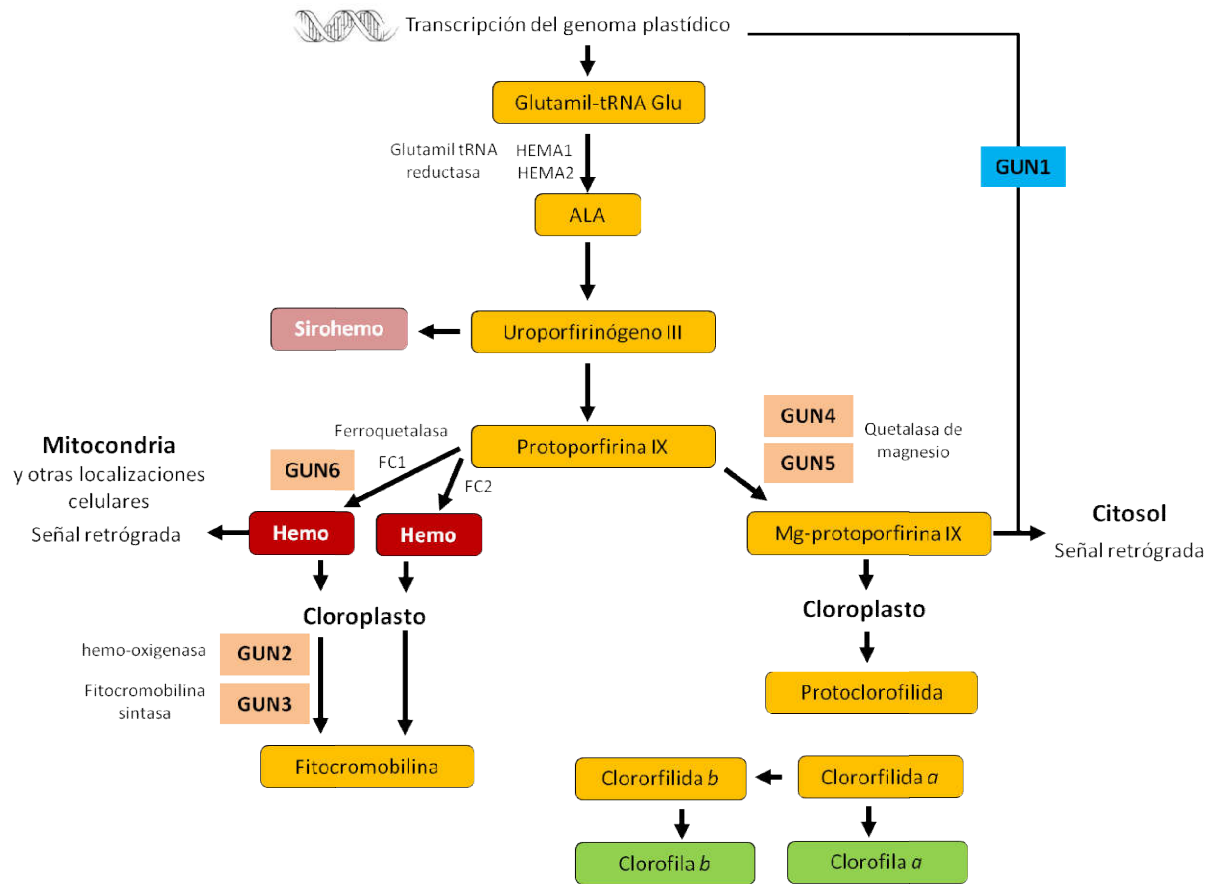


Figura I.6 La ruta de los tetrapirroles en plantas con enzimas clave, mutantes gun así como la generación de señales retrógradas

En el caso de la rama de la síntesis de la clorofila, tanto GUN5 como GUN4 están involucrados en la biosíntesis de Mg-Protoporfirina IX. Bajo estrés oxidativo, el Mg-Protoporfirina IX se acumula en el plástido y se exporta al citoplasma a través de un mecanismo desconocido resultando en la represión de los PhANGs. En la rama hemo de la biosíntesis de tetrapirroles, intervienen GUN6 (ferroquelatasa, FC1), GUN2 (hemo-oxigenasa, HY1) y GUN3 (fitocromobilina sintasa, HY2) donde el hemo actúa como regulador positivo en la expresión de PhANGs. El mecanismo exacto a través del cual hemo llega al núcleo o diferentes componentes que median la señal hacia el núcleo es todavía desconocido. GUN1 parece actuar como punto de convergencia entre la regulación de la expresión del genoma plastídico y la vía de los tetrapirroles, aunque aun su rol no es del todo conocido. Este esquema ha sido adaptado a partir de (Terry & Smith 2013; Singh et al. 2015)

3.1.2 Señales retrógradas dependientes del PGE

El estudio de mutantes afectados en la transcripción, la edición del RNA o la traducción de proteínas del plastoma, o de plantas tratadas con inhibidores de algunos de estos procesos como LIN o CAP, han puesto en relieve la importancia del PGE en la comunicación cloroplasto-núcleo (Rapp & Mullet 1991; Kakizaki et al. 2012; Terry & Smith 2013). Debido a que el mutante *gun1* es el único capaz de restaurar la expresión de PhANGs en respuesta tanto a NFZ como LIN (Koussevitzky et al. 2007), se han realizado numerosos estudios para determinar la implicación de *GUN1* en las señales dependientes de PGE. *GUN1* codifica una proteína plastídica con un dominio rico en

prolinas (PPR) de unión a RNA y que posiblemente controla la traducción de proteínas en el cloroplasto (Koussevitzky et al. 2007) (**Figura I.6**). En presencia de inhibidores del PGE o de NFZ, GUN1 reprimiría la síntesis de proteínas del plasto y consiguientemente la expresión de los genes PhANGs. Las proteínas que presentan un dominio PPR suelen estar implicadas no solo en la traducción de proteínas, sino también en la estabilidad, procesamiento y edición del mRNA (Koussevitzky et al. 2007). Por esta razón se ha postulado que GUN1 también podría mediar los cambios en la edición de RNA plastídico que se observan tanto en presencia de NFZ como de LIN (Kakizaki et al. 2012).

Las señales dependientes de PGE dependen a su vez del estado redox en el cloroplasto, ya que la ARN polimerasa que se encarga de la transcripción de los genes plastídicos de las siglas en inglés *plastid-encoded RNA polymerase* (PEP) se encuentra regulada por el estado de la cadena de transporte electrónico (Pfannschmidt & Liere 2005). El mutante *plastid redox insensitive 2* (*prin2*), deficiente en PEP, tiene reprimida también la transcripción del gen *LIGHT-HARVESTING COMPLEX b* (*LHCB*) bajo condiciones ambientales. Los niveles del gen *LHCB* se pueden restablecer en el fondo mutante *gun1* indicando que *GUN1* y *PRIN2* actúan de forma coordinada en la señal retrógrada y en la transcripción del plastoma (Kindgren et al. 2012a). Sin embargo, *GUN1* y *PRIN2* parecen no actuar conjuntamente en condiciones de alta intensidad lumínica (Kindgren et al. 2012a).

Otros factores relacionados con PGE y que participan en señal retrógrada son los factores sigma plastídicos (SIGs), proteínas utilizadas por la PEP para transcribir sets específicos de genes plastídicos. Tanto *SIG2* como *SIG6* regulan los PhANGs de forma parcialmente redundante pero mediante rutas diferentes (Woodson et al. 2013). Así los mutantes *sig2* y *sig6* tienen reprimida la expresión de *LHCB* y esta expresión puede ser restaurada en el fondo *gun1* (Woodson et al. 2013).

De forma similar a lo observado con *gun1*, la expresión de los genes PhANGs se recupera en presencia de NFZ y LIN en mutantes deficientes en factores de transcripción como ABI4 (ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4) y PTM (Sun et al. 2011). PTM es un factor de transcripción de tipo PHD que posee dominios transmembrana que le permiten anclarse a la membrana del cloroplasto. En respuesta a señales retrogradadas de varios tipos, la proteína se procesa y su extremo amino-terminal se transporta al núcleo, donde activa a ABI4.

Por otro lado, el análisis de mutantes impedidos en el importe de proteínas plastídicas codificadas por el genoma nuclear mostró una represión en los PhANGs. Este es el caso del mutante *plastid protein import2* (*ppi2*), que carece de una de las proteínas del complejo de importe de la membrana exterior del cloroplastos (Toc159) y como

resultado exhibe un fenotipo albino. En este mutante, los genes PhANGs *LHCB* y la subunidad pequeña de la Rubisco (*SSU*) se encuentran reprimidos (Kakizaki et al. 2009). Esta represión está regulada por los factores de transcripción GOLDEN2-LIKE (GLK), que actúan de forma conjunta con GUN1, pero no a través de la vía de señalización de los tetrapirroles ni a través de ABI4, sino por una vía distinta aun desconocida (Kakizaki et al. 2009; Waters et al. 2009).

3.2 Señales retrógradas operacionales

En presencia de patógenos, sequía o una mayor intensidad lumínica, los cloroplastos son capaces de inducir señales retrógradas de tipo operacional (Kleine et al. 2013). Uno de los grupos más estudiados y relevantes de señales operacionales son las derivadas del estado redox de los cloroplastos. Hay tres grupos diferentes de señales derivadas del estado redox que controlan la expresión de PhANGs: i) el estado de oxidación-reducción de los componentes acoplados a la cadena de transporte electrónico, de las siglas en inglés *photosynthetic electron transport chain* (PET); ii) la generación de especies reactivas de oxígeno de las siglas en inglés *reactive oxygen species* (ROS); y iii) el intercambio de metabolitos entre el cloroplasto y el citosol (Kindgren et al. 2012b). Hasta ahora se han estudiado de forma individual pero estas señales se encuentran coordinadas a nivel metabólico, espacial, temporal y fisiológico (Dietz 2015).

Los cambios en el estado redox de PET, que son los primeros en ocurrir en los tilacoides del cloroplasto, se asocian con el pool de plastoquinonas (PQ), la viabilidad del fotosistema I, productos metabólicos como NADPH, y el sistema tiorredoxina-ferredoxina. En bajas intensidades, se induce la oxidación de plastoquinol (PQH_2) a PQ y la reducción de la tiorredoxina, mientras que en altas intensidades se da la reducción de las PQ y la oxidación de la tiorredoxina (Brautigam et al. 2009). Por otro lado, en presencia de alta intensidad lumínica el O_2 actúa como aceptor de electrones de la cadena de transporte electrónico en vez del $NADP^+$, induciendo la formación de moléculas ROS (Asada, 2006). Como consecuencia se genera 1O_2 por el triplete de la clorofila en el fotosistema II, mientras que la transferencia de un electrón al O_2 desde el fotosistema I, resulta en la formación de O_2^- que dará lugar a H_2O_2 . Algunas de estas señales ROS se han propuesto como señales retrógradas. El H_2O_2 es el mejor candidato, mientras que el 1O_2 y O_2^- se piensa que tienen una menor relevancia como señales debido a que tienen poco tiempo de vida, mucha reactividad y baja habilidad de difusión (Kochevar 2004; Mullineaux et al. 2006). Estas moléculas plastídicas ROS, junto con el cambio en el estado redox de los componentes de PET, inducen por mecanismos aun desconocidos cambios transcripcionales en genes nucleares asociados a la respuesta redox de las siglas en inglés *plastid redox-associated nuclear genes* (PRANGs) (Chan et al. 2016) (Figura I.5).

Se han estudiado diferentes proteínas que actúan en la vía de regulación de los PRANGs en respuesta a los cambios redox del cloroplasto. Este es el caso de las proteínas cloroplastídicas EXECUTER1 y 2 (EX1 y EX2), que median la respuesta de muerte celular asociada a la presencia de $^1\text{O}_2$ (**FIGURA I.5**). Estas proteínas son capaces de reprimir la muerte celular del mutante *flu* (que produce elevadas cantidades de $^1\text{O}_2$) en el paso de oscuridad a luz (Kim et al. 2008). Esto no ocurre sin embargo en elevadas intensidades de luz ni en presencia de oscuridad donde se inducen aun mayores cantidades de $^1\text{O}_2$. Esto podría indicar o bien que esta complementación depende de la cantidad de $^1\text{O}_2$ (Lepistö & Rintamäki 2012) y/o de la participación de otras señales ROS inducidas en estas condiciones.

Otro caso es la proteína quinasa State Transition 7 (STN7), cuya fosforilación hace posible la captura de protones por el PSI para preservar la homeostasis del cloroplasto y prevenir la formación de ROS (Tikkanen et al. 2012). Algunos factores de transcripción que participan en la mediación de la señal son ZAT10 (Rossel et al. 2007), Rap2.4a (Hiltscher et al. 2014) y factores de choque térmico, estos últimos con una elevada relevancia en las respuestas a elevadas intensidades de luz (Jung et al. 2013).

Otra ruta de señal retrógrada caracterizada asociada a la presencia de ROS y a la activación de PRANGs es la vía 3'(2'), 5'-bifosfato nucleotidasa 1 (SAL1) - 3'-fosfoadenosina 5'-fosfato (PAP) (Estavillo et al. 2011). Esta vía de señal retrógrada tiene un gran impacto en la respuesta a estrés oxidativo, ya que cuando se desregula se altera el 35% del transcriptoma en presencia de elevada intensidad lumínica. SAL1 se localiza en cloroplasto y mitocondrias y actúa como antagonista de PAP, regulando negativamente su acumulación. Bajo elevada intensidad lumínica o sequía, se da un incremento en la acumulación de PAP (**Figura I.5**), pasando desde el cloroplasto al citosol y finalmente al núcleo, donde inhibe las 5'-3' exorribonucleasas (XRN5). Como parte de la represión de estas XRN5 se da una activación de la expresión de los PRANGs y de genes de respuesta a estrés oxidativo como la ascorbato peroxidasa (APX2) que se encarga de convertir H_2O_2 en H_2O (Estavillo et al. 2011; Rossel et al. 2007).

3.3 Señales retrógradas y carotenoides

Los carotenoides son fundamentales para la protección de los cloroplastos frente al daño fotooxidativo causado por el exceso de luz. Cuando esta fotoprotección es insuficiente, se generan señales retrógradas para ajustar la fotosíntesis a las nuevas condiciones ambientales. Curiosamente, algunos precursores de los carotenoides y algunos de sus derivados apocarotenoides también contribuyen a este proceso, ya que actúan como moléculas señal que acaban dirigiéndose al núcleo para regular la expresión génica (Chan et al. 2016).

El MEcPP, que es un intermediario de la vía del MEP (**Figura I.1**), constituye una señal retrógrada de tipo operacional que se acumula en elevadas intensidades lumínicas, cuando se produce un estrés oxidativo (**Figura I.5**). El MEcPP es capaz de viajar del cloroplasto al núcleo para inducir la expresión del gen nuclear que codifica la proteína cloroplastídica hidroxiperoxido liasa (HPL) y otros genes implicados en la respuesta a estrés biótico (Xiao et al. 2012; González-Cabanelas et al. 2015). En cambio, la respuesta nuclear del MEcPP no incluye cambios en PhANGs y pertenece a una ruta independiente de GUN1 (Xiao et al. 2012).

ABA, la fitohormona apocarotenoides más estudiada, también ha sido catalogada como una señal retrógrada (Leister 2012; Baier & Dietz 2005) (**Figura I.5**), ya que es capaz de acumularse en respuesta a la fotooxidación de la cadena de transporte electrónico y inducir la transcripción de diferentes enzimas antioxidantes que se encuentran codificadas en el núcleo, como APX2. Los precursores del ABA también están regulados por el potencial redox. En presencia de elevada intensidad lumínica, el pH del lumen del cloroplasto se acidifica, y este cambio en el pH induce la unión de la VDE a las membranas de los tilacoides, y por tanto su actividad enzimática. Como resultado la violaxantina se transforma en zeaxantina que resulta más eficiente para disipar el exceso de energía (Hieber et al. 2000).

Por otro lado, la presencia de $^1\text{O}_2$, generada por el daño oxidativo, puede atacar al β -caroteno y provocar la generación no enzimática de apocarotenoides como β -ionona, α -ionona, DHA, o β -ciclocitral. Estos dos últimos metabolitos son capaces de actuar como una señal retrógrada implicada en las vías de señalización de ROS en plantas, induciendo cambios en la expresión de genes nucleares relacionados con la respuesta a estrés oxidativo (Ramel et al. 2012; Shumbe et al. 2014) (**Figura I.5**).

Además de actuar como señales retrógradas implicadas en respuestas de fotoprotección, los apocarotenoides son capaces de regular los genes nucleares de la carotenogénesis (McQuinn et al. 2015). Por ejemplo, la sobreacumulación de neurosporeno o prolicopeno induce la expresión nuclear de *PSY1* en tomate, se cree que de forma dependiente a CCDs (Kachanovsky et al. 2012).

Los apocarotenoides además ejercen un rol esencial en la regulación del desarrollo de los plastos, las hojas y las raíces. Un ejemplo es la señal aun desconocida generada por la pérdida de función del enzima ZDS en el mutante *clb5*, que controla el desarrollo del cloroplasto y el desarrollo de la hoja (Avendaño-Vázquez et al. 2014). Plantas mutantes *clb5* tienen alterada la morfología foliar y muestran alteraciones en la expresión de muchos genes plastídicos y nucleares tipo PhANGs (Avendaño-Vázquez et al. 2014). Curiosamente *clb5* fenocopia el mutante *enf2*, implicado en el desarrollo de la parte abaxial de la hoja (Tameshige et al. 2013). En ambos casos es necesaria la presencia de

GUN1 para el arresto del desarrollo en las hojas, indicando que esta señal procede del cloroplasto. Sin embargo, aun queda por descubrir como estas señales son transducidas vía GUN1. La señal que se propone en el caso de *clb5* es dependiente del corte del ζ -caroteno o fitoflueno (Avendaño-Vázquez et al. 2014). Otra señal desconocida derivada de carotenoides controla el desarrollo de las raíces laterales mediante el control de la expresión de genes nucleares (Van Norman et al. 2014).

3.4 Señales retrógradas y luz

Múltiples estudios basados en el tratamiento de plantas con inhibidores de la biogénesis del cloroplasto, han mostrado que las señales retrógradas interaccionan con las rutas de señalización de luz para controlar el desarrollo de la planta (Ruckle et al. 2012; Larkin & Ruckle 2008; Ruckle et al. 2007; Ruckle & Larkin 2009; Larkin 2014). Las interacciones entre la luz y la señalización retrógrada se sugirieron porque la luz y las señales plastídicas regulan de forma común la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis (Ruckle et al. 2012). Esta coordinación resulta primordial para la biogénesis del cloroplasto (Ruckle et al. 2007).

Aunque señales dependientes de GUN1 pueden regular la expresión de genes fotosintéticos en la oscuridad, GUN1 parece converger con rutas de transducción lumínica para regular la expresión de genes fotosintéticos como *LHCB* en función de la calidad y cantidad de luz (Ruckle et al. 2007). Además de la vía de señalización retrógrada dependiente de GUN1 (que depende de ABI4 para reprimir la expresión génica mediante la unión al motivo CCAC en genes de respuesta a luz), se ha propuesto la existencia de otra ruta independiente de GUN1 pero dependiente de tetrapirroles que regula la expresión de PhANGs mediante HY5 (Kindgren et al. 2012b). Por tanto, ambos factores, HY5 y ABI4 actuarían coordinadamente aguas abajo de la señalización retrógrada para coordinarla con la señal lumínica (Ruckle et al. 2007; Larkin & Ruckle 2008; Xu et al. 2016).

Un estudio muy reciente muestra que las señales retrógradas dependientes de LIN y NFZ reprimen la desetiología induciendo un cambio en la actividad de los PIFs y los genes que éstos reprimen (Martín et al. 2016). En él se ha descrito una vía de señalización dependiente de GUN1 aunque independiente de PIFs en la que los fitocromos y las señales retrógradas convergen en la regulación del factor de transcripción implicado en la fotomorfogénesis GLK1 (Martín et al. 2016). Otro estudio reciente también ha mostrado que el modulo HY5-ABI4 está implicado en la convergencia de la señal lumínica y la señal retrógrada durante la desetiología (Xu et al. 2016). Sin embargo, la relevancia de la señalización retrógrada para la respuesta a luz una vez concluido el periodo de desetiología (por ejemplo, para el SAS) ha sido mucho menos estudiada.

Objetivos

Objetivos

En esta tesis nos planteamos dos objetivos principales:

- **Identificar factores moleculares implicados en la regulación de la síntesis de carotenoides en respuesta a sombra.** Estudios previos han demostrado que la regulación transcripcional del primer paso de la vía de síntesis de carotenoides (PSY) es fundamental para regular el flujo metabólico de la misma. También se han identificado algunos factores de transcripción capaces de regular el único gen codificante para este enzima en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (PIF1, HY5). En la tesis se estudiará el papel de estos factores de transcripción en la regulación de la síntesis de carotenoides en respuesta a sombra y se buscarán nuevos factores implicados en esta respuesta.
- **Explorar si los carotenoides influyen en la respuesta a sombra a través de la generación de señales retrógradas.** Se sabe que algunos compuestos derivados de los carotenoides, como el ABA y el β -ciclocitral, actúan como señales retrógradas. En esta tesis se estudiará si los carotenoides y sus derivados son necesarios para la respuesta a sombra estimada como alargamiento del hipocotilo en plántulas expuestas a un tratamiento de luz que simula la proximidad de otras plantas sin cambios en la intensidad de luz.

Resultados

Resultados

Capítulo 1: Regulación de la síntesis de carotenoides en respuesta a sombra

La respuesta a sombra más estudiada hasta ahora es la inducción de la elongación del hipocotilo, que se encuentra regulada de forma muy precisa por un balance dinámico entre reguladores positivos y reguladores negativos, funcionando como un mecanismo de gas y freno (Roig-Villanova et al. 2007). Sin embargo, también se sabe que el SAS implica una disminución en la cantidad de pigmentos (Roig-Villanova et al. 2007) cuya regulación, aunque es importante para la supervivencia de la planta, aun se desconoce (Bou-Torrent, Toledo-Ortiz & Ortiz-Alcaide 2015). Debido a que en *Arabidopsis* PIF1 inhibe la transcripción del gen *PSY*, que codifica la principal enzima de la ruta de la carotenogénesis (Toledo-Ortiz et al. 2010; Toledo-Ortiz et al. 2014) y que a su vez los PIFs son regulados negativamente por PAR1, un inductor de la carotenogénesis (Galstyan et al. 2011), quisimos explorar el papel de los PIFs y de PAR1 en la regulación de la biosíntesis de carotenoides en respuesta a sombra. Además también decidimos estudiar el posible rol de *HY5*, un inductor directo de la expresión del gen *PSY* durante la desetiolación que actúa de forma antagonista a los PIFs para una gran cantidad de respuestas, entre ellas el desarrollo de la planta en luz (Toledo-Ortiz et al. 2014; Leivar & Quail 2011).

1.1 Papel de los PIFs

Trabajos previos en el laboratorio demostraron que la biosíntesis de carotenoides se encuentra regulada de forma muy precisa durante la desetiolación. Concretamente, en estas condiciones la acumulación de carotenoides depende, entre otros factores, de la desrepresión de la transcripción de *PSY* debida a la degradación de PIF1 y otros PIFs fotolábiles (cuarteto PIFq) tras la iluminación (Toledo-Ortiz et al. 2010). La exposición a sombra (es decir, a bajo R/FR), por el contrario, induce la acumulación de las proteínas PIFq (PIF1, PIF3, PIF4 y PIF5) y también la unión del PIF fotoestable PIF7 a sus promotores diana, actuando por tanto como reguladores positivos del SAS (Lorrain et al. 2008; Leivar et al. 2012b) .

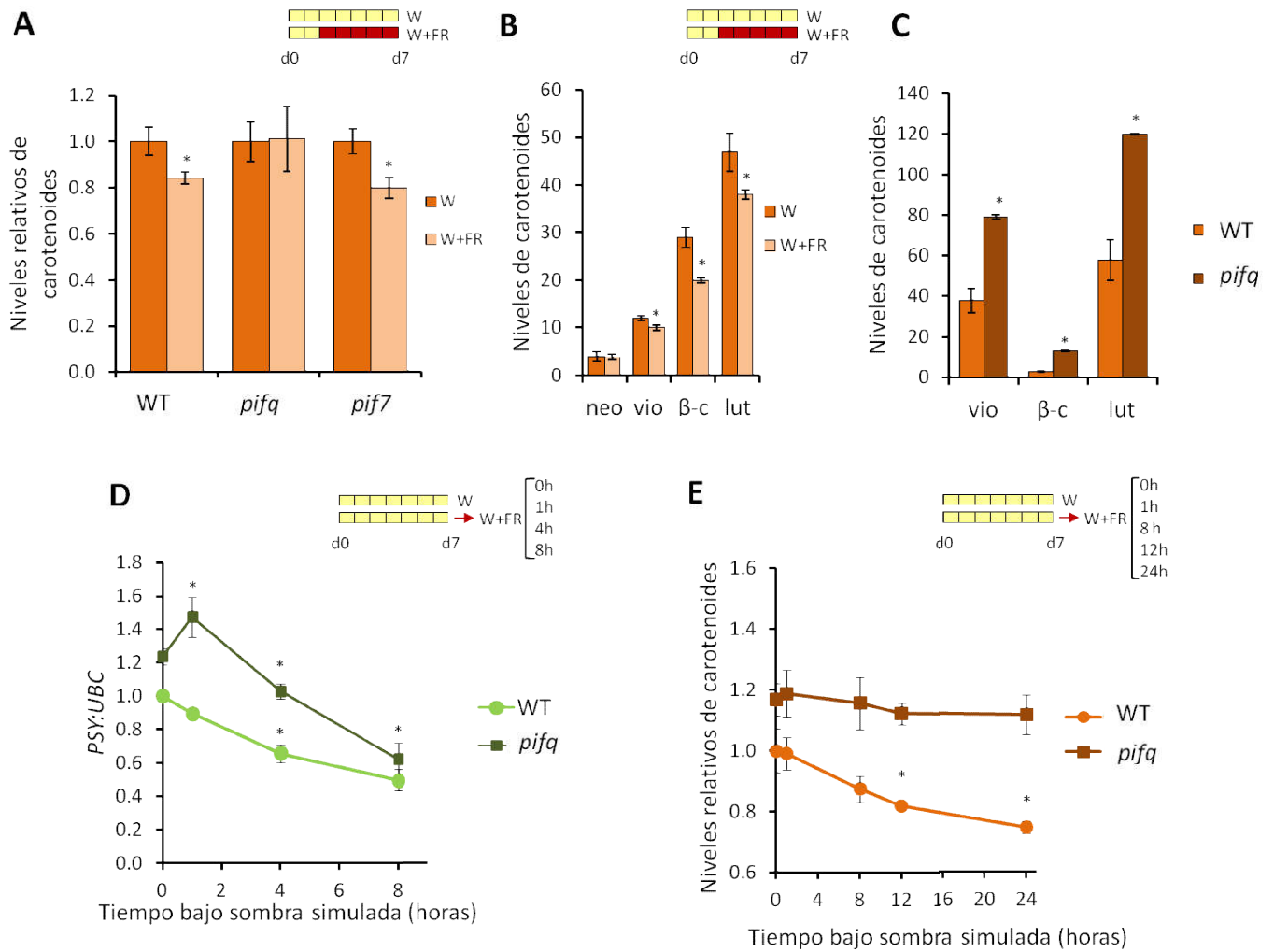


Figura R1.1 Niveles de transcritos de *PSY* y de carotenoides en plantas WT y defectivas en PIFs expuestas a sombra simulada.

A) Análisis por HPLC de los niveles de carotenoides de plantas WT expuestas durante 2 días en luz W y después transferidas a luz W o W+FR durante 5 días. La cantaxantina, un carotenoide no presente en plantas se usó como estándar interno. En el gráfico se muestra el % de carotenoides relativos a los niveles totales de pigmentos de muestras crecidas en W. Se muestran las medias y la SD de tres replicas biológicas (n=3). B) Carotenoides cuantificados a nivel espectrofotométrico en plantas WT, *pifq* y *pif7-2* crecidas durante 2 días en W y transferidas a W o W+FR durante 5 días más. Se muestran los valores relativos a los niveles de carotenoides del WT en luz W y la SD de tres réplicas biológicas (n=3). Las abreviaturas corresponden a: Neoxantina (neo), violaxantina (vio), β -caroteno (β -c), luteína (lut). C) Plantas WT y *pifq* se germinaron y crecieron durante 3 días en oscuridad y después se recogieron para el análisis por HPLC. En el gráfico se muestra el % de carotenoides relativos a los niveles totales de pigmentos de muestras WT etioladas. Se muestran las medias y la SD de tres replicas biológicas independientes (n=3). D) PCR cuantitativa (qPCR) de los niveles de transcrito de *PSY* en plantas WT, *pifq* y *pif7-2* crecidas durante 7 días en luz W y tratadas con W+FR durante 1, 4 y 8 horas. El enzima UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME (UBC) gen (At5g25760) se utilizó como normalizador. Los valores se muestran relativos a plantas WT crecidas en W y corresponden a medias y SD de tres réplicas biológicas (n=3). E) Niveles relativos de carotenoides cuantificados a nivel espectrofotométrico respecto a los valores totales de carotenoides del WT en luz W de plantas crecidas durante 7 días en luz W y después transferidas a W+FR durante 1, 8, 12 y 24 horas. Se muestran las medias y la SD de tres réplicas biológicas (n=3). Los asteriscos en B muestran las diferencias significativas respecto a los niveles de carotenoides del WT en luz W ($p < 0.05$). Los asteriscos en E muestran las diferencias significativas respecto a los niveles de carotenoides de plantas WT etioladas mediante la Prueba t de Student

($p < 0.05$). Los asteriscos en D muestran las diferencias significativas respecto a los niveles de transcritos de *PSY* del WT en luz W mediante la Prueba t de Student ($p < 0.05$).

Para investigar la implicación de los PIFs en la regulación de la biosíntesis de carotenoides en respuesta a sombra se cuantificaron los niveles de carotenoides totales en plantas silvestres (WT), *pifq* (cuádruple mutante *pif1*, *pif3*, *pif4*, *pif5*) y *pif7-2*, un mutante nulo (Leivar et al. 2008a), expuestas o no a un tratamiento que simula la sombra por proximidad vegetal. En concreto, las 3 líneas indicadas se crecieron durante 2 días en luz blanca (W) y después algunas plantas se dejaron creciendo en W durante 5 días más y otras se trataron con W suplementada con FR (W+FR) también durante 5 días. Tras la exposición a sombra pudimos observar un decrecimiento significativo ($p < 0.05$) en la cantidad total de carotenoides en el WT (**Figura R1.1A**) tal y como estaba previamente descrito (Roig-Villanova et al. 2007). Para investigar si este decrecimiento afectaba principalmente a especies concretas de carotenoides, se cuantificaron los carotenoides individuales mediante HPLC. Al comparar plantas WT tratadas con W+FR frente a las tratadas con W observamos una disminución similar de los principales carotenoides (violaxantina, β -caroteno y luteína) presentes en las muestras (**Figura R1.1B**). En el caso de *pif7-2* se observó una disminución en la cantidad total de carotenoides durante el tratamiento de sombra muy similar a la del WT, siendo también significativa ($p < 0.05$). Sin embargo, las plantas *pifq* no presentaban esta disminución (**Figura R1.1A**). Estas plantas deficientes en el quarteto PIQq presentan unos niveles basales mayores de carotenoides individuales en comparación con el WT (**Figura R1.1C**), lo que es consistente con los mayores niveles de carotenoides totales presentes en las plantas *pifq* observados anteriormente (Toledo-Ortiz et al. 2010).

Para determinar si los PIFq inducen cambios rápidos en la expresión de *PSY* y analizar su posible efecto en la biosíntesis de carotenoides en respuesta a sombra, se midieron los niveles de transcritos de *PSY* y se cuantificaron los niveles de carotenoides tanto en plantas WT como en *pifq* en tratamientos de sombra cortos (7 días en W seguido de tratamientos de 1, 4 y 8 horas con W+FR). Mientras que los transcritos de *PSY* disminuyen rápidamente en el caso de las plantas WT, en el mutante *pifq* se observa un pico inicial de inducción en la expresión de *PSY*, aunque después disminuye hasta finalmente alcanzar niveles similares a los del WT al cabo de 8h (**Figura R1.1D**). Consistentemente con los resultados observados con tratamientos prolongados (5 días) de W+FR, en plantas WT se observa una disminución en los niveles de carotenoides después de 12h de exposición a sombra simulada ($p < 0.05$) mientras que en el caso de *pifq* no se observa una disminución significativa a pesar de la caída en los niveles de transcritos de *PSY* (**Figura R1.1E**).

1.2 Papel de HY5

Estudios recientes muestran que la represión de *PSY* por PIF1 está antagonizada por HY5, un factor de transcripción bZIP que se acumula en la luz y se degrada en la oscuridad vía COP1 (Osterlund et al. 2000; Ang et al. 1998). PIF1 (y, en general, PIFq) y HY5 actúan de forma antagonista para una gran cantidad de respuestas, incluyendo el desarrollo en luz y adaptación a temperatura (Toledo-Ortiz et al. 2014; Leivar & Quail 2011), el control de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Chen et al. 2013) y la respuesta a hormonas (Lau & Deng 2010). Para determinar si *HY5* regula a *PSY* en respuesta a sombra, se crecieron plantas WT y mutantes *hy5-2* (SALK_056405), un alelo nulo (Oh & Montgomery 2013), durante 7 días en W y después se pasaron a W+FR durante 1h, 4h y 8h y se midieron los niveles de transcrito de *PSY* por PCR cuantitativa. Nuestros resultados muestran que tanto en el WT como en el mutante los niveles de transcritos de *PSY* decrecen significativamente ($p < 0.05$) a medida que aumenta el tiempo de exposición a sombra, y que además el mutante *hy5-2* tiene una expresión de *PSY* significativamente más reducida que el silvestre (**Figura R1.2A**), siendo consistente con el rol positivo previamente descrito que ejerce en el control de la transcripción de *PSY* (Toledo-Ortiz et al. 2014).

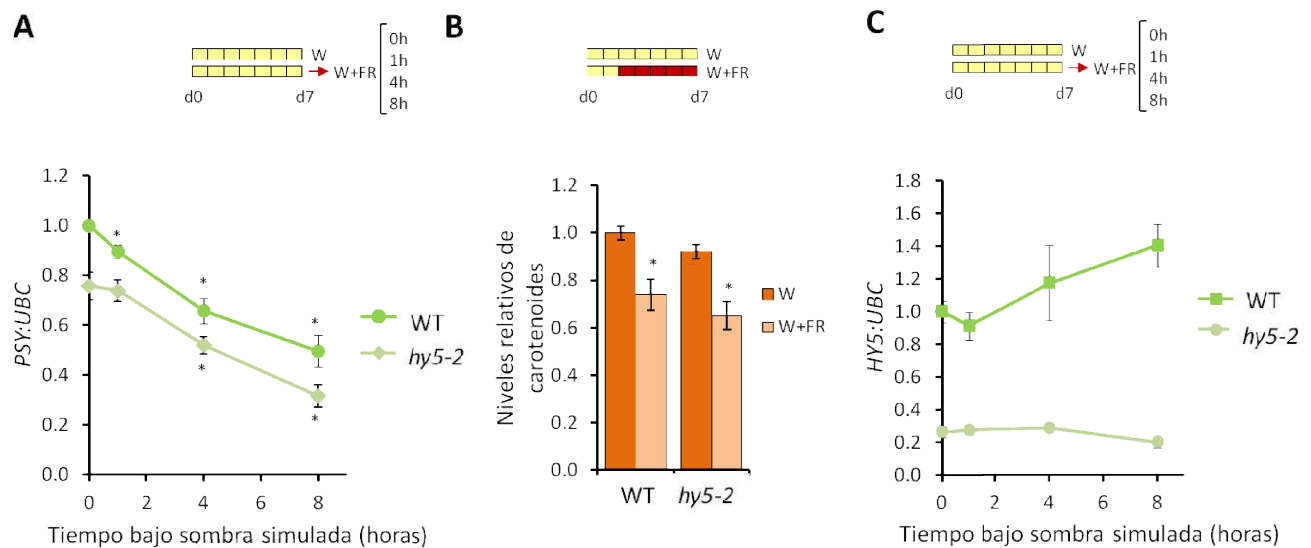


Figura R1.2 Contribución de HY5 en la regulación de los niveles de transcrito *PSY* y de carotenoides durante la exposición a sombra simulada.

A) Análisis por qPCR de los niveles de transcritos de *PSY* en plantas WT y *hy5-2* crecidas durante 7 días en luz W y tratadas en W+FR durante los tiempos indicados. Se representan las medias de los valores relativos respecto plantas WT crecidas en W y la SD de tres réplicas biológicas ($n=3$). B) Carotenoides cuantificados a nivel espectrofotométrico en plantas WT, *hy5-2* crecidas durante 2 días en W y transferidas a W o W+FR durante 5 días más. Se muestran los valores relativos a los niveles de carotenoides del WT en luz W y la SD de tres réplicas biológicas ($n=3$). C) Análisis por qPCR de los niveles de transcritos de *HY5* en plantas WT y *hy5-2* crecidas durante 7 días en luz W y tratadas en W+FR durante los tiempos indicados. Se representan las medias de los valores relativos respecto plantas WT crecidas en W y la SD de tres réplicas biológicas ($n=3$). Los asteriscos en A y C muestran las diferencias

significativas respecto a los niveles de transcritos de los genes indicados respecto al WT en luz W mediante la Prueba t de Student ($p < 0.05$). Los asteriscos en B muestran las diferencias significativas respecto a los niveles de carotenoides de plantas WT en luz W mediante la Prueba t de Student ($p < 0.05$).

Con tal de estudiar si HY5 tiene un rol en el control de la biosíntesis de carotenoides independiente de la expresión de *PSY*, se compararon los niveles de carotenoides en plantas WT y mutantes tratadas con W o W+FR durante 5 días. De acuerdo con los menores niveles de expresión de *PSY*, las plantas *hy5-2* acumulan menor cantidad de carotenoides que el WT tanto en W como en W+FR, pero la respuesta de disminución en respuesta a sombra simulada es similar en ambos genotipos (**Figura R1.2B**). Nuestros resultados nos indican que HY5 parece no regular directamente la respuesta del gen *PSY* o la síntesis de carotenoides tras el tratamiento con sombra y que por tanto el modulo de activación y represión de HY5-PIF1 parece no ser relevante en este proceso. Sin embargo, la expresión del gen *HY5* se induce ligeramente tras la exposición a W+FR aunque no de forma significativa (**Figura R1.2C**), lo que sugiere un posible papel de este factor de transcripción en el SAS.

1.3 Papel de PAR1

PAR1 es una proteína HLH a la que le falta el dominio de unión al ADN y actúa como antagonista de los PIFs y de otros factores de transcripción bHLH, que sí que son capaces de unirse al ADN, mediante la formación de heterodímeros que impiden su unión al ADN o a otros factores de transcripción (Galstyan et al. 2011; Cifuentes-Esquivel et al. 2013). Durante el SAS, PAR1 es un regulador negativo del alargamiento del hipocotilo y positivo de la síntesis de carotenoides (Roig-Villanova et al. 2006; Roig-Villanova et al. 2007). Como PAR1, HFR1 es otro cofactor transcripcional que interacciona con PIFs y previene su unión a promotores diana (Galstyan et al. 2012; Galstyan et al. 2011; Hornitschek et al. 2009), pero no se conoce si regula la biosíntesis de carotenoides.

Para estudiar si PAR1 y HFR1 regulan la biosíntesis de carotenoides modulando la expresión de *PSY*, se midieron los niveles de carotenoides y los niveles de transcrito de *PSY* de plantas sobreexpresoras de PAR1-GFP (Roig-Villanova et al. 2007) y de plantas sobreexpresoras de una versión truncada de HFR1 (GFP-ΔN-HFR1), más estable que la original *in vivo* (Galstyan et al. 2011). Ambas líneas transgénicas se crecieron junto al WT durante 7 días en W y a continuación se midieron los niveles de carotenoides totales y de transcritos de *PSY* (**Figura R1.3A**). Tal y como se observa en la gráfica, las plantas sobreexpresoras PAR1-GFP presentaron una acumulación significativamente superior ($p < 0.05$) de pigmentos respecto a la WT, así como un incremento en la expresión de *PSY*. Por el contrario, las plantas sobreexpresoras de GFP-ΔN-HFR1 mantuvieron unos niveles parecidos a los del WT tanto a nivel de carotenoides como

de expresión de *PSY*. Estos resultados sugieren que PAR1 podría regular la síntesis de carotenoides activando la expresión de *PSY*, mientras que HFR1 parece no tener un papel relevante en el control de la carotenogénesis.

Por otro lado, para estudiar el impacto de PAR1 durante la carotenogénesis en los primeros estadios de la respuesta a sombra, se midieron los niveles de transcrito *PSY* y los niveles de carotenoides de plantas crecidas durante 7 días en W y transferidas a W+FR durante 1h, 8h, 12h, y 24h. Los resultados muestran que mientras que en las plantas WT disminuye la cantidad de carotenoides de forma significativa ($p<0.05$), las líneas sobreexpresoras de PAR1-GFP no presentan cambios significativos en cantidad de carotenoides (**Figura R1.3B**). De forma similar, la presencia de transcrito *PSY* disminuye progresivamente de forma significativa ($p<0.05$) en el WT, mientras que en el caso de PAR1-GFP los niveles de transcritos de *PSY* (que siempre son mayores que en el WT) muestran un decrecimiento más lento (**Figura R1.3C**).

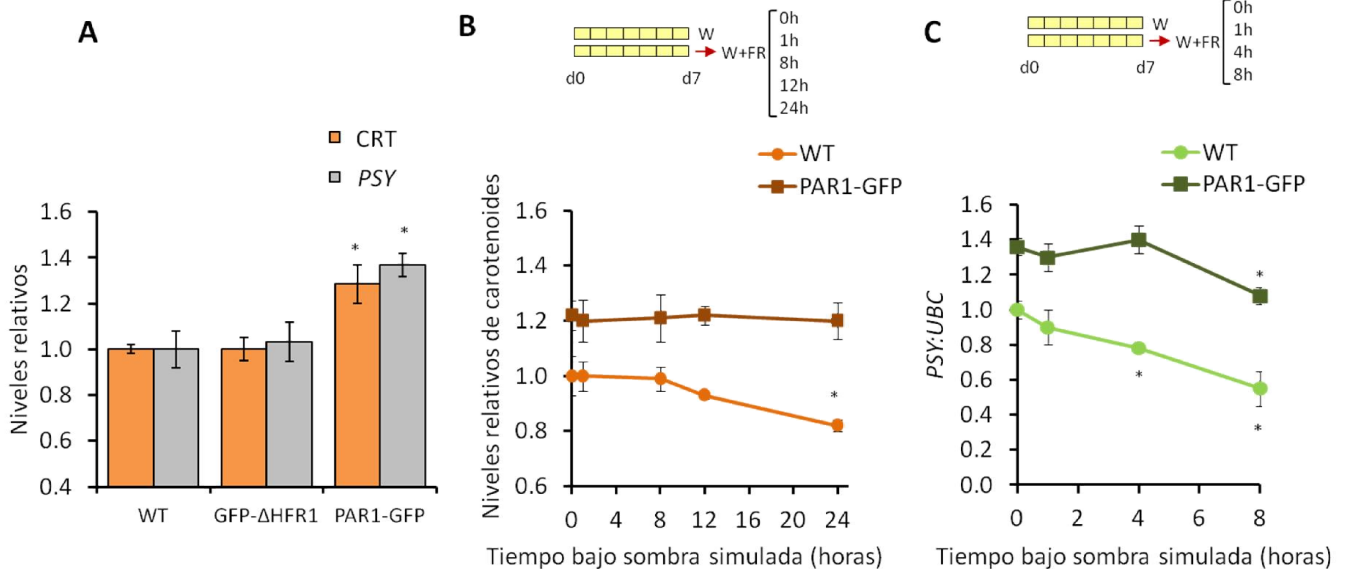


Figura R1.3 Contribución de PAR1 y HFR1 en el control de la expresión de *PSY* y de la biosíntesis de carotenoides durante el SAS.

A) Niveles de carotenoides (barras naranjas) y abundancia de transcritos (barras grises) en plantas productoras de las proteínas de fusión GFP-ΔHFR1 y PAR1-GFP y WT crecidas durante 7 días en W. Los valores están relativizados a las muestras WT y corresponden a las medias y a la SD de 3 réplicas independientes ($n=3$). B) Carotenoides medidos a nivel espectrofotométrico de plantas WT y plantas sobreexpresoras de PAR1 (PAR1-GFP). Las plantas crecieron durante 7 días bajo luz W y fueron después tratadas con W+FR en los tiempos indicados. Los valores se representan como relativos a los niveles de carotenoides del WT en W y representan las medias de 3 experimentos independientes ($n=3$). C) Niveles de transcritos de *PSY* de las líneas descritas en B. Se muestran los valores relativos a las plantas WT crecidas en W y corresponden a la media y SD de tres replicas biológicas independientes $n=3$. Los asteriscos marcan las diferencias significativas ($p<0.05$) relativas a plantas WT crecidas en luz W mediante la Prueba t de Student ($p<0.05$).

Según nuestros resultados, el mutante *pifq* y la línea sobreexpresora de PAR1-GFP tienen comportamientos similares en comparación al WT ya que acumulan niveles constitutivamente mayores de carotenoides (**Figura R1.1E y Figura R1.3B**) y de transcritos de *PSY* (**Figura R1.1D y Figura R1.3C**), no presentan una disminución de los niveles de carotenoides en respuesta a sombra (**Figura R1.1E y Figura R1.3B**), y muestran una disminución más atenuada en los niveles de transcritos de *PSY* (**Figura R1.1D y Figura R1.3C**). Por lo tanto, PIFq y PAR1 actúan de forma antagonista en la regulación de la expresión de *PSY* y la acumulación de carotenoides tanto en condiciones normales como en respuesta a sombra. Complementando este resultado, se demostró mediante experimentos de doble híbrido en levadura (Y2H) y complementación bimolecular en plantas (BiFC) que PAR1 puede unirse directamente a PIF1. Experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) confirmaron además que esta interacción impide la unión de PIF1 al promotor de *PSY*, regulando así su expresión y por tanto la síntesis de carotenoides en respuesta a sombra (Bou-Torrent, Toledo-Ortiz & Ortiz-Alcaide 2015).

1.4 Papel de proteínas interactoras de PAR1

Las plantas *pifq* mostraron un pico de inducción de *PSY* a 1h después de la señal de sombra (**Figura R1.1D**), mientras que las plantas sobreexpresoras de PAR1-GFP no mostraron ese pico (**Figura R1.3C**). Este resultado sugiere que durante los primeros momentos de la respuesta a sombra, en los que la expresión de *PAR1* es máxima (Bou-Torrent, Toledo-Ortiz & Ortiz-Alcaide 2015), PAR1 impide la unión al promotor de *PSY* de otros represores además de los PIFs. Para buscar estos represores, se partió de datos de Y2H previos que identificaron proteínas interactoras de PAR1 (Cifuentes-Esquivel et al. 2013). Entre las proteínas capaces de interaccionar con PAR1 en levadura se encontraron 28 factores de transcripción en 8 de las 12 familias de proteínas bHLH (Heim et al. 2003), siendo la más común la familia XII (Bou-Torrent, Toledo-Ortiz & Ortiz-Alcaide 2015). De los 12 miembros de la familia XII que interaccionaron con PAR1 en los experimentos de Y2H, se seleccionaron 7 para su estudio posterior basándonos en 2 criterios: disponían de mutantes de inserción de T-DNA en las colecciones públicas y su expresión cambiaba en respuesta a sombra. Si estas proteínas eran reguladoras de la expresión de *PSY* en respuesta a sombra, se esperaba que los correspondientes mutantes mostraran patrones alterados en sus niveles de transcritos de *PSY*, lo que a su vez podría generar alteraciones en los niveles de carotenoides. Sólo 2 mutantes cumplieron esta predicción: *bHLH78-2* (At5g48560) y *bHLH60-1* (At3g57800).

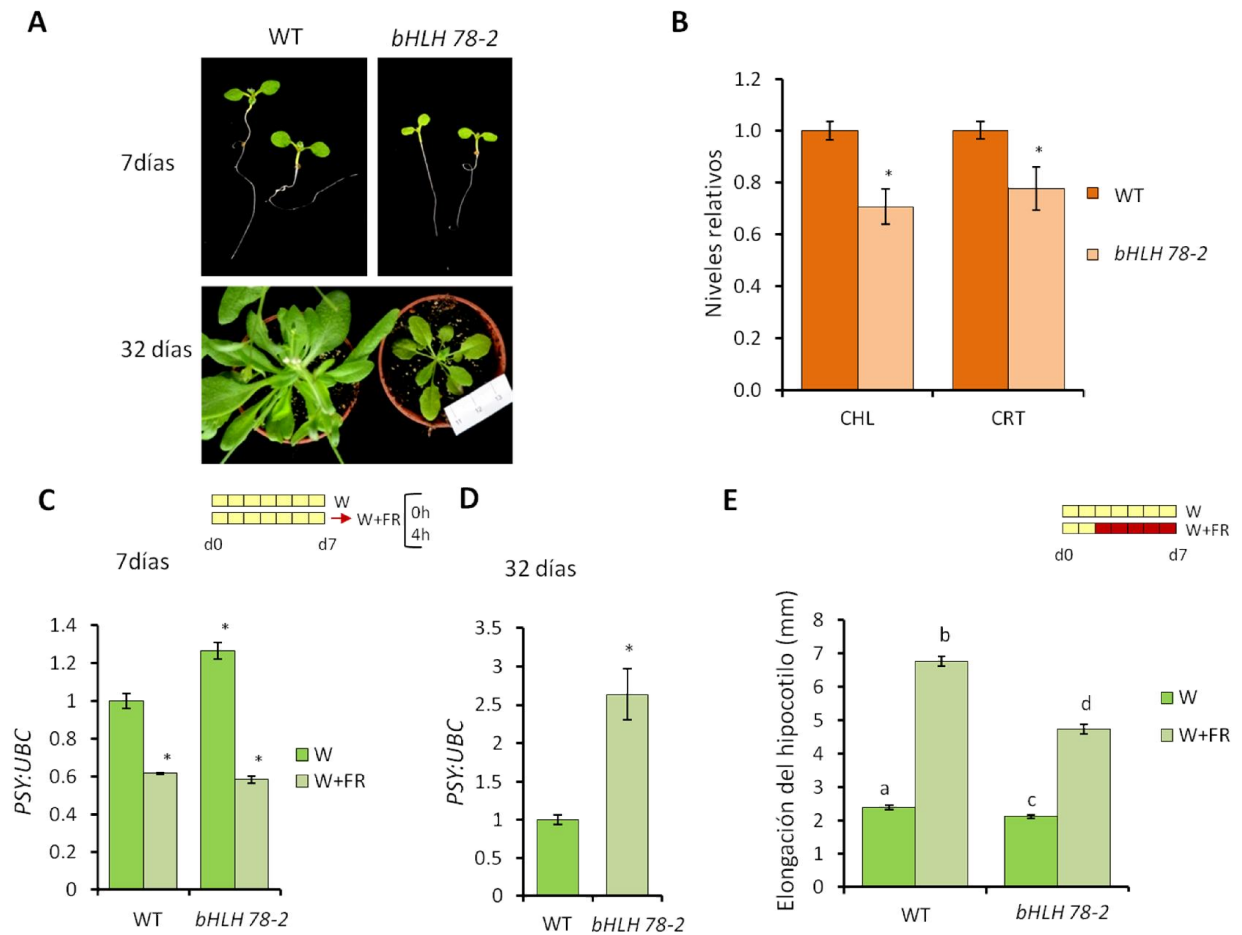


Figura R1.4 Implicación de la línea *bHLH 78-2* en la regulación de la respuesta a sombra.

A) Caracterización fenotípica de mutantes deficientes en *bHLH 78-2* en comparación con plantas WT crecidas durante 7 días en luz W y durante 32 días en luz W. B) Niveles de clorofilas (CHL) y carotenoides (CRT) caracterizados a nivel espectrofotométrico de las líneas mostradas en A crecidas durante 7 días en W. Se muestran las medias de niveles relativos de CHL y CRT respecto a plantas WT de 4 réplicas biológicas (n=4). C) Transcritos de *PSY* determinados mediante qPCR de muestras de RNA extraídas de las líneas mostradas en A crecidas durante 7 días en W y después transferidas durante 4h a W o a W+FR. Se representan las medias de los niveles relativos de transcrito *PSY* respecto a plantas WT crecidas en W como control de 3 réplicas independientes (n=3). Transcritos de *PSY* determinados por qPCR de las líneas mostradas en A crecidas durante 32 días en W. Se muestra la media y SE de 3 muestras independientes (n=3) relativizadas a los valores del WT. E) Elongación del hipocotilo en sombra de las líneas mostradas en A y crecidas como en C. La elongación del hipocotilo se midió usando el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/>) en las imágenes digitales. Las columnas representan la media y SE de un conjunto de 30 plántulas para cada genotipo y tratamiento (n=30) de un experimento representativo. En B, C, D los asteriscos muestran diferencias significativas respecto a palantulas WT crecidas en W determinadas mediante la Prueba t de student ($p < 0.05$). En E, las diferencias significativas están representadas por letras diferentes determinadas mediante la Prueba t de Student ($p < 0.05$).

Curiosamente, en el caso de los mutantes *bHLH78-2* observamos un fenotipo visual contrario al esperado para una pérdida de función de represores de la carotenogénesis: son más pálidos. Además, mostraron cotiledones y hojas de menor tamaño y un retardo en el desarrollo (**Figura R1.4A**). El análisis de los niveles de carotenoides de plantas *bHLH78-2* crecidas durante 7 días en W confirmó niveles significativamente menores ($p < 0.05$) tanto de carotenoides como de clorofilas en

comparación con el WT (**Figura R1.4B**). Se midieron también los niveles de transcrito de *PSY* en plantas crecidas durante 7 días en W y expuestas durante 4h a W+FR (**Figura R1.4C**). De forma inesperada, los resultados mostraron un incremento significativo en los niveles de transcrito de *PSY* en luz W del mutante *bHLH78-2* respecto al WT ($p < 0.05$), lo que sí es consistente con un posible papel de la proteína BHLH78 en la represión de *PSY*. La correlación negativa entre niveles aumentados de *PSY* y niveles disminuidos de carotenoides se confirmó también en plantas *bHLH78-2* crecidas en tierra, que mostraron 2.5 veces más transcritos *PSY* que las plantas WT a pesar de mostrar un claro fenotipo pálido (**Figura R1.4D**). Sin embargo, en respuesta a sombra se observaba la misma disminución de los niveles de transcrito de *PSY* tanto en el WT como en el mutante (**Figura R1.4C**). Este resultado contrasta con la respuesta a sombra del mutante a nivel de alargamiento del hipocotilo, sensiblemente atenuada con respecto a la del WT (**Figura R1.4E**). Por tanto, el mutante *bHLH78-2* muestra características similares al mutante *pifq* y las plantas sobreexpresoras de PAR1-GFP en cuanto a los niveles de *PSY* en W y el alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra (Leivar et al. 2012b) pero opuestas en cuanto a la acumulación de carotenoides en W y la respuesta del gen *PSY* al tratamiento con W+FR.

Por otra parte, también se ha caracterizado el mutante *bHLH60-1*. Éste mutante presenta un fenotipo de penetrancia incompleta en homocigosis. Mientras que la mayor parte de individuos mutantes son fenotípicamente idénticos al WT, un 7% de individuos presentan un fenotipo enano y más verde (**Figura R1.5A**) que recuerda al del mutante *pifq* y la línea sobreexpresora PAR1-GFP. Los individuos *bHLH60-1* enanos también mostraron un retardo en el desarrollo y fueron incapaces de dar silicuas fértiles (**Figura R1.5A**). Dada la dificultad para obtener tejido, los niveles de pigmentos de este mutante y sus cambios en respuesta a sombra se cuantificaron a partir de la autofluorescencia de los cloroplastos obtenida por microscopía confocal. Semillas del mutante y del WT se germinaron en medio de cultivo sólido (placa) y se dejaron crecer durante 2 días en W. Posteriormente se identificaron las plantas mutantes enanas con fenotipo verde intenso y se pasaron a dos nuevas placas, realizándose la misma operación con algunas plantas WT y mutantes sin fenotipo. A continuación se dejaron crecer en W o W+FR durante 5 días más y se observaron por microscopía confocal.

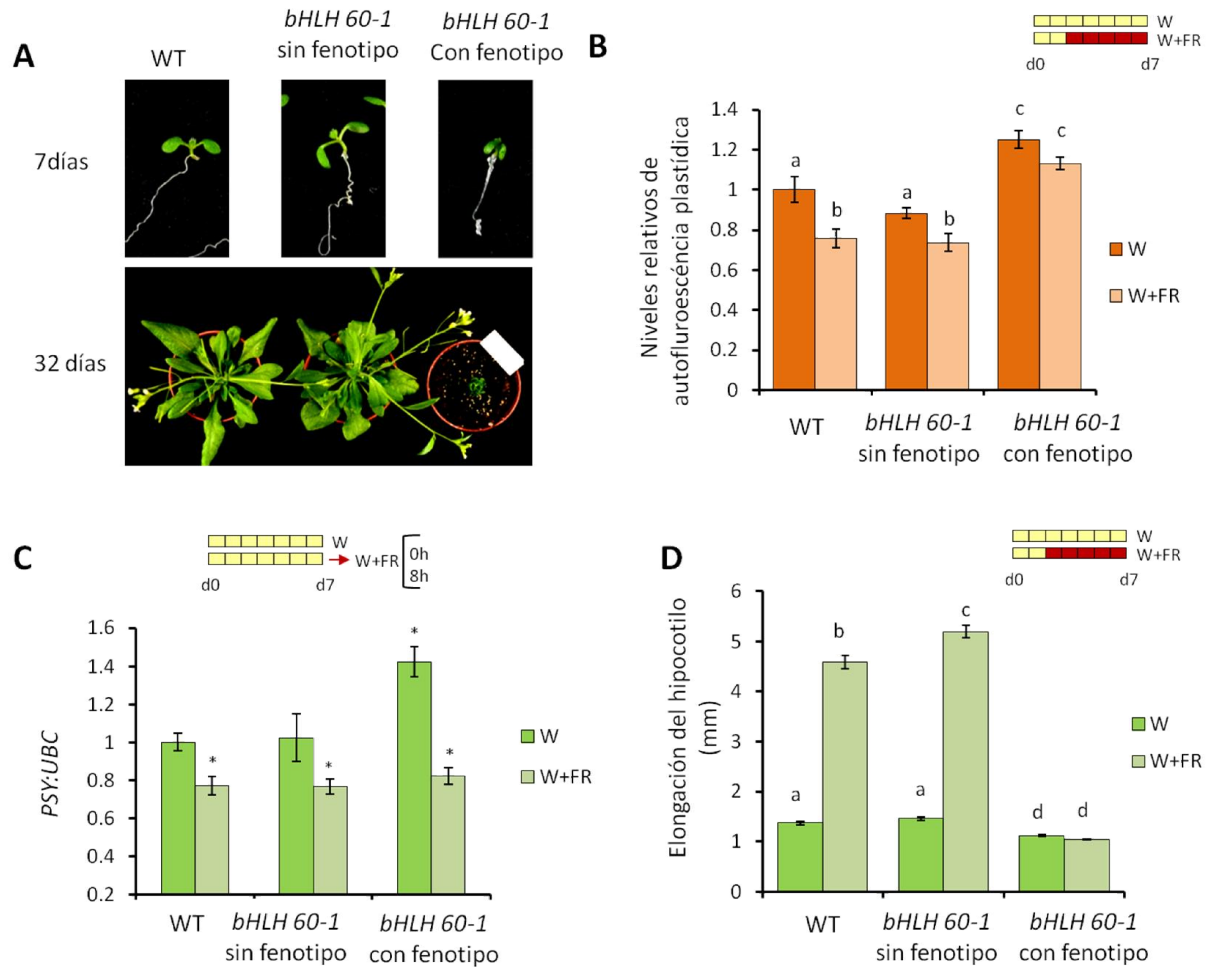


Figura R1.5 Implicación de la línea *bHLH 60-1* en la regulación de la respuesta a sombra.

A) Caracterización fenotípica de mutantes deficientes en *bHLH 60-1* en comparación con plantas WT crecidas durante 7 días en luz W y durante 32 días en luz W. B) Niveles de clorofilas (CHL) determinados a partir de la autofluorescencia de la clorofila a partir de fotografías de plantas WT, *bHLH60-1* con y sin fenotipo crecidas durante 2 días en W y posteriormente transferidas a W o W+FR durante 5 días más. Se muestran las medias de niveles relativos de CHL respecto a plantas WT crecidas en W de 5 réplicas biológicas (n=5). La determinación de la fluorescencia se realizó mediante el programa de microscopía confocal Fluoview de Olympus. C) Transcritos de *PSY* determinados mediante qPCR de muestras de RNA extraídas de las líneas mostradas en A crecidas durante 7 días en W y transferidas durante 8 horas a W o W+FR. Se representan las medias de los niveles relativos de transcrito *PSY* respecto a plantas WT crecidas en W como control de 3 réplicas independientes (n=3). D) Elongación del hipocotilo en sombra de las líneas mostradas en B crecidas como en B. Las columnas representan la media y SE de 30 plántulas (n=30) de cada genotipo por cada tratamiento de un experimento representativo. En B y C los asteriscos muestran diferencias significativas mediante Prueba t de Student ($p < 0.05$) respecto a plántulas WT crecidas en W. En E, las diferencias significativas están representadas por letras diferentes determinadas mediante la Prueba t de Student ($p < 0.05$).

Tanto el WT como las plantas mutantes con y sin fenotipo mostraron una reducción de los niveles de autofluorescencia de los cloroplastos causada por la presencia de pigmentos (clorofilas y carotenoides) después del tratamiento con W+FR. Sin embargo, esta reducción no fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el caso de las plantas mutantes con fenotipo (**Figura R1.5B**). Además, el mutante *bHLH60-1* con fenotipo presentaba mayores niveles de autofluorescencia tanto en W como W+FR (**Figura R1.5B**) recordando de nuevo el comportamiento de las plantas *pifq* o de la línea sobreexpresora PAR1-GFP (Bou-Torrent, Toledo-Ortiz & Ortiz-Alcaide 2015). La similitud con estas líneas también se observó al cuantificar los niveles de transcritos de *PSY* antes y después de tratar plantas WT y *bHLH60-1* de los dos fenotipos con W+FR durante 8h (**Figura R1.5C**). Las plantas *bHLH60-1* con fenotipo presentaron una mayor cantidad de transcritos de *PSY* antes del tratamiento de sombra, en concordancia con su fenotipo más verde (**Figura R1.5A, B**), pero niveles similares a los del WT o las mutantes sin fenotipo tras 8h de exposición a W+FR (**Figura R1.5C**). También se caracterizó la respuesta a sombra del mutante *bHLH60-1* a nivel de elongación del hipocotilo, y se observó que el mutante con fenotipo fue incapaz de responder (**Figura R1.5E**), lo que de nuevo es consistente con un papel de la proteína BHLH60 similar al de los PIFs.

Capítulo 2: Papel de los carotenoides en la respuesta a sombra

2.1 La respuesta a sombra requiere cloroplastos funcionales

Hasta hace relativamente poco se creía que la única relación entre los cloroplastos y la luz era energética, es decir, la derivada de la fotosíntesis. Pero actualmente se sabe que los cloroplastos también desempeñan un papel regulador de las respuestas a la luz, tanto a nivel cuantitativo (por ejemplo, por exceso de luz) como cualitativo (por ejemplo, mediada por los fitocromos) (Larkin & Ruckle 2008). Algunas señales retrógradas enviadas por los cloroplastos para ajustar la expresión de genes nucleares derivan de la degradación oxidativa de los carotenoides por medios tanto enzimáticos como no enzimáticos (Chan et al. 2016). Se conoce muy poco sobre cómo las señales retrógradas están integradas en las rutas de señalización de luz. En esta parte de la tesis se estudiará si defectos en el funcionamiento de los cloroplastos (inducidos mediante tratamientos farmacológicos) afectan la respuesta de las plantas a la luz, estimada a partir de cambios moleculares y celulares asociados al alargamiento del hipocotilo de plántulas expuestas a tratamientos de sombra.

2.1.1 Puesta a punto del sistema experimental

El término sombra hace referencia a una reducción del R/FR causado por la presencia de plantas vecinas que absorben preferencialmente la luz R y reflejan o transmiten FR (Martínez-García et al. 2010). El grado de reducción del R/FR también informa a la planta sobre si sus vecinas compiten por la irradiación solar. Por ejemplo, cuando la planta crece próxima a vegetación pero no está sombreada, la luz reflejada por esta vegetación tiene un R/FR bajo. Por otra parte, cuando la planta crece bajo un dosel arbóreo la luz que recibe está filtrada a través de las hojas de otras plantas y por tanto tiene un R/FR muy bajo (Roig-Villanova & Martínez-García 2016). La percepción de estos cambios en la calidad de la luz corre a cargo de los fitocromos. En concreto, el fitocromo B (phyB) es el principal fitocromo implicado en el SAS, aunque colabora con los fitocromos phyC-E y su antagonista phyA de forma redundante para regular diferentes aspectos del SAS (Martínez-García et al. 2014). Una de las respuestas más estudiadas del SAS es la elongación del hipocotilo tras la irradiación con luz de bajo R/FR. Los fitocromos implicados en esta respuesta en particular son phyA y, sobre todo, phyB.

Para estudiar si los cloroplastos en general y los carotenoides en particular modulan la respuesta a distintos tipos de sombra, usamos inicialmente el inhibidor fosmidomicina (FSM), que bloquea específicamente la ruta del MEP y por tanto la síntesis de

isoprenoides plastídicos como las clorofilas y los carotenoides (Rodríguez-Concepción & Boronat 2002) (**Figura R2.1**). Las plantas germinadas y crecidas en medio suplementado con FSM tienen comprometida la función fotosintética y por tanto para los experimentos de esta tesis se decidió añadir sacarosa (1%) al medio de crecimiento. De esta manera, las plantas disponen de una fuente de carbono alternativa a la obtenida normalmente por la fijación del CO₂.

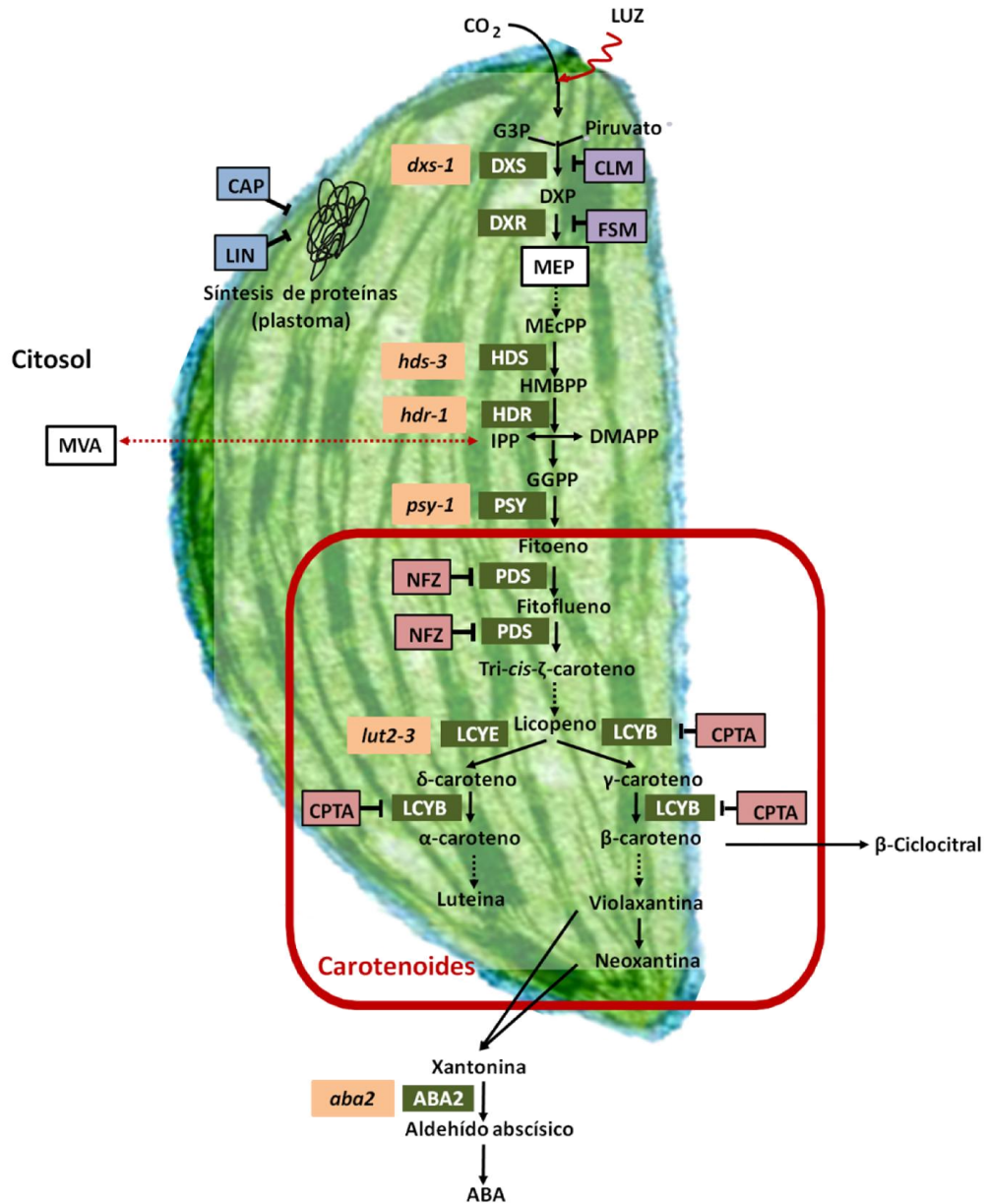


Figura R2.1 Esquema resumen de la vía del MEP, de carotenoides y de apocarotenoides (ABA y β-ciclocitral) en el interior del cloroplasto, así como la localización de los inhibidores y mutantes utilizados durante la tesis.

Se indican las enzimas que catalizan cada paso (recuadros verdes) y la reacción reprimida por los inhibidores utilizados durante la tesis: inhibidores de la síntesis de proteínas del cloroplasto (recuadros azules), inhibidores de la vía del MEP (recuadros lilas) e inhibidores de la síntesis de carotenoides (cuadrados rojos). También se representan los mutantes de la vía del MEP, de carotenoides y apocarotenoides utilizados durante la tesis (cuadrados naranjas). Las abreviaturas se describen al inicio de la tesis.

Semillas de plantas WT y mutantes deficientes en *phyA* (*phyA-501*) o *phyB* (*phyB-9*) se sembraron en medio suplementado con sacarosa y con o sin FSM y tras 3 o 4 días a 4°C (estratificación) se pasaron a una cámara de cultivo a 21 °C y se incubaron durante 2 días en W. Después se dejaron en W o se irradiaron con luz de R/FR=0.050 (W+FRa, que simula sombra de proximidad) o R/FR=0.025 (W+FRb, que simula sombra de dosel) durante 5 días más. Finalmente, se midió la longitud de los hipocotilos al concluir cada uno de los tratamientos. Los resultados se muestran en la **Figura R2.2**.

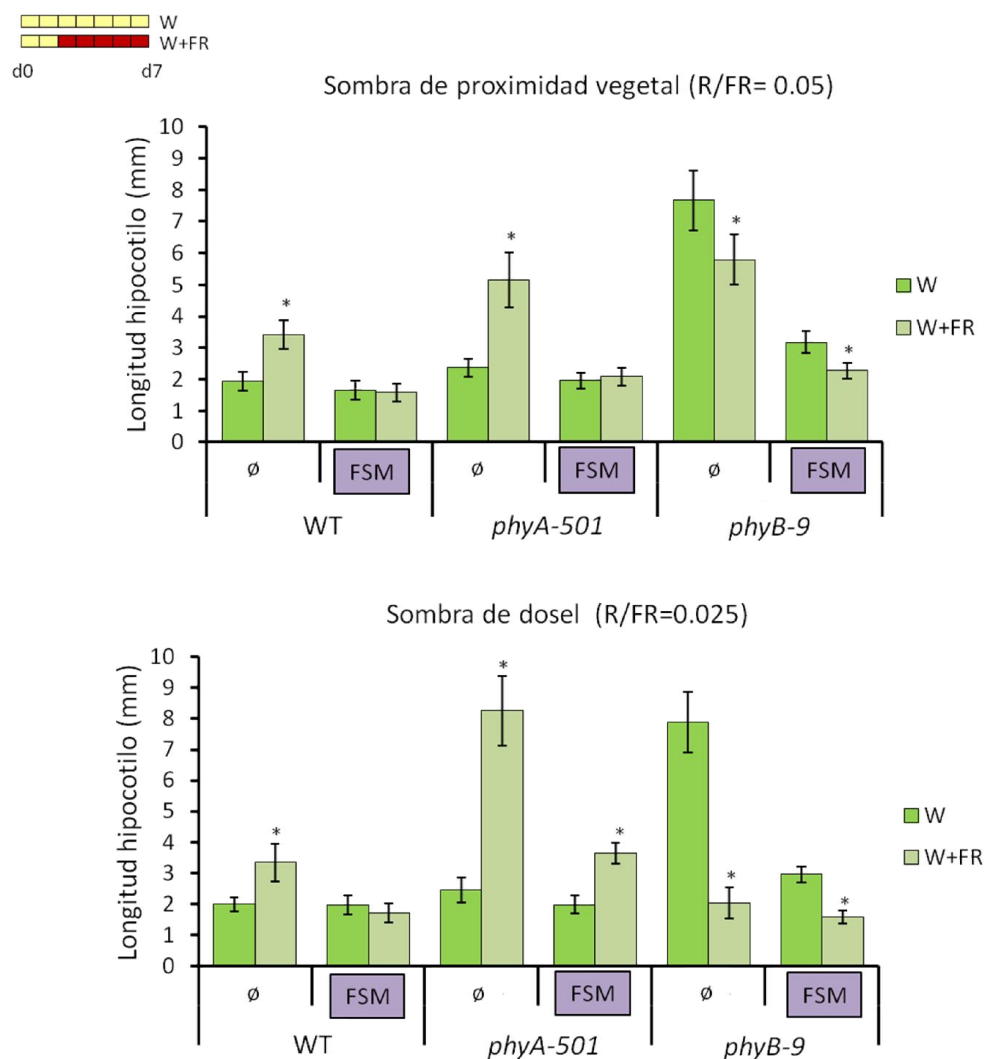


Figura R2.2 Caracterización de la respuesta de elongación del hipocotilo en presencia de diferentes tipos de sombra en presencia de cloroplastos disfuncionales.

Longitud del hipocotilo de plantas WT, *phyA-501*, *phyB-9* sembradas en medio suplementado con sacarosa 1% y en presencia o ausencia de 500μM de Fosmidomicina (FSM). Se crecieron durante 2 días en luz W y transferidas a W o W+FR simulando proximidad vegetal o de dosel durante 5 días más a 21 °C. La elongación del hipocotilo se midió mediante el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/>) a partir de las imágenes digitales. Las columnas representan la longitud media y el error estándar (SE) de (n= 30) plántulas para cada genotipo y tratamiento de un experimento representativo. Los asteriscos muestran las diferencias significativas determinadas mediante la Prueba t de Student (p<0.05) respecto a las plántulas del mismo genotipo crecidas en W.

En el caso de las plantas WT crecidas sin FSM, la inducción de la elongación del hipocotilo es similar en respuesta a W+FRa y W+FRb, mientras que las crecidas con FSM no se alargan, lo que sugiere que esta respuesta requiere cloroplastos funcionales. El mutante *phyA-501* se alarga más que el WT en respuesta a sombra cuando crece sin FSM, y la respuesta de elongación es mucho mayor en el caso de las condiciones que simulan sombra por dosel. Se ha postulado que esto se debe a que la capacidad inhibidora de phyA es mayor cuando hay más FR (es decir, en el tratamiento W+FRb) y por tanto la pérdida de función de phyA en el mutante *phyA-501* tendría un efecto más evidente en estas condiciones (Martínez-García et al. 2014). En presencia de FSM, al irradiar con W+FRb se observa una respuesta de elongación (aunque muy atenuada), pero ello no ocurre en W+FRa. Esta elongación se debe a la percepción y transducción de la señal de luz por phyB. Al contrario que las plantas WT y *phyA-501*, el mutante *phyB-9* presenta un hipocotilo más largo en W que cuando se expone a sombra simulada. Las diferencias entre tratamientos son más dramáticas al irradiar con W+FRb, debido a la mayor actividad represora de la elongación de phyA en estas condiciones. Las plantas *phyB-9* tratadas con FSM son más cortas que las no tratadas en W, y son capaces de responder a sombra tanto de proximidad como de dosel (en este caso, alargándose menos que en W). Por tanto, podemos confirmar que la falta de respuesta a sombra de las plantas WT cuando se bloquea la síntesis de pigmentos fotosintéticos requiere la presencia de phyB. El resto de experimentos de la tesis se realizaron usando como tratamiento de sombra simulada W+FRb (abreviado como W+FR a partir de ahora).

2.1.2 Las plantas con cloroplastos disfuncionales tienen reprimida la respuesta a sombra

Con tal de confirmar si la presencia de carotenoides o/y cloroplastos funcionales es necesaria para inducir el SAS, se sembraron semillas de *Arabidopsis* en presencia de nuevos inhibidores y se determinó su respuesta a sombra. En concreto, se utilizó un inhibidor de la biosíntesis de carotenoides (norflurazón; NFZ) (Breitenbach et al. 2001), o de la síntesis de proteínas del cloroplasto (lincomicina; LIN) (Nott et al. 2006; Koussevitzky et al. 2007) (**Figura R2.1**). Las concentraciones usadas de estos inhibidores inducían un gradiente de palidez en las plantas hasta generar plantas totalmente albinas a medida que se iba bloqueando la función de los cloroplastos funcionales (**Figura R2.3A**). Plantas WT se sembraron en un medio suplementado con sacarosa y el correspondiente inhibidor, y se crecieron durante 2 días en W para después ser iluminadas con W+FR (o con W como control) durante 5 días más. Posteriormente se midió la elongación del hipocotilo para cuantificar la respuesta a sombra. En la **Figura R2.3B** se representa la longitud del hipocotilo (mm) en W y en W+FR, mientras que en la **Figura R2.3C** se representa el cociente entre ambas longitudes (mm en W+FR / mm en W) como medida de la intensidad de respuesta (un

valor de 1 significa ausencia de respuesta, mientras que valores positivos representan alargamiento en respuesta a sombra).

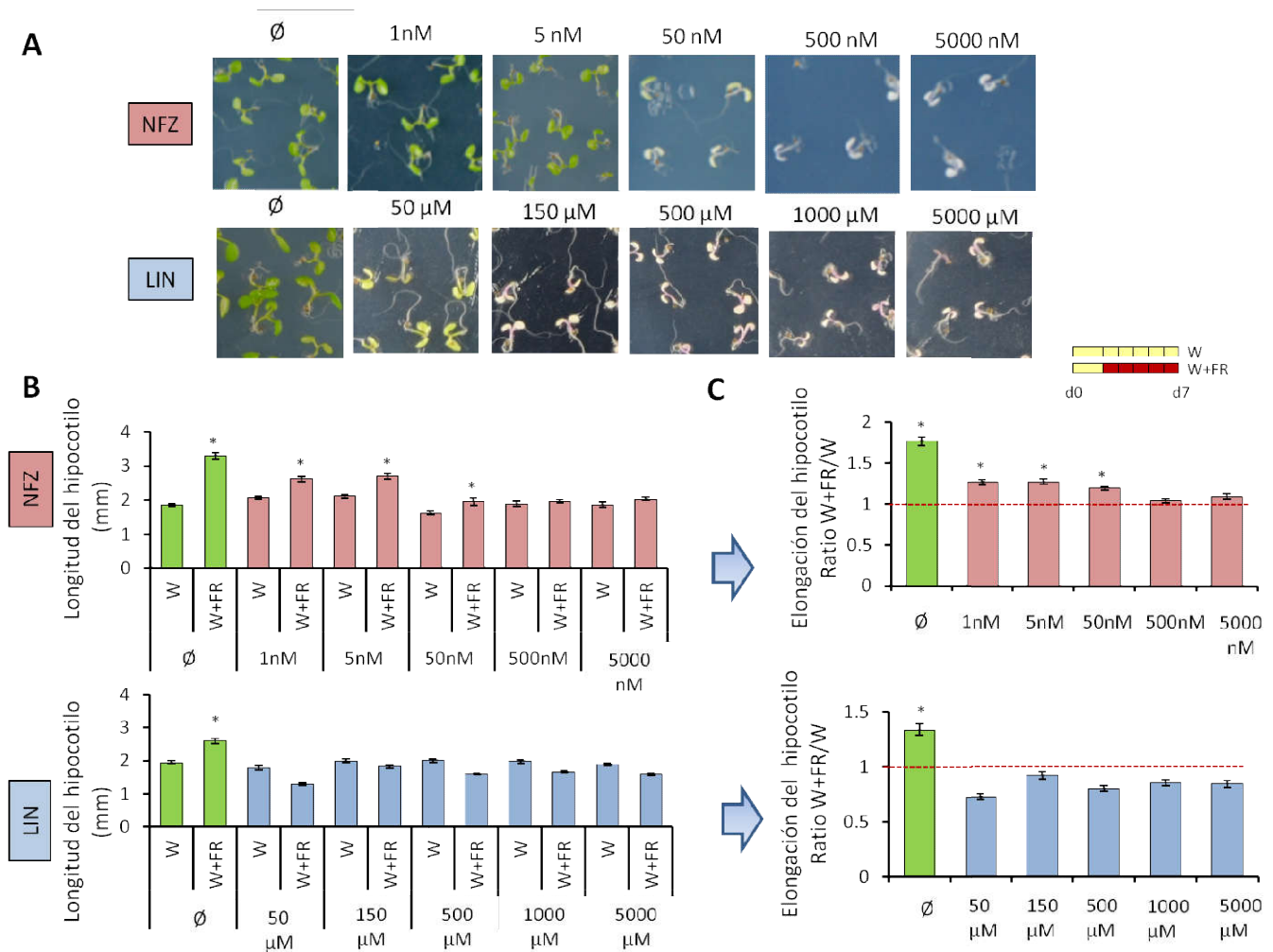


Figura R2.3 Elongación del hipocotilo en respuesta a sombra en presencia de concentraciones crecientes de inhibidores del cloroplasto.

A) Fenotipo de plántulas WT sembradas en medio suplementado con concentraciones crecientes de Norflurazon (NFZ) y Lincomicina (LIN) y crecidas en luz W durante 7 días. B) Longitud del hipocotilo en sombra de plantas WT crecidas en las concentraciones especificadas en A durante 2 días en luz W y transferidas a W o W+FR 5 días más. Las columnas representan la longitud media y SE de (n= 30) plántulas para cada genotipo por tratamiento respecto a las plántulas crecidas en W en la misma concentración de inhibidor de un experimento representativo. C) Representación de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra como el ratio de la longitud del hipocotilo en W+FR vs. la longitud del hipocotilo en W de las mismas muestras y condiciones que se muestran en B. La dispersión se muestra como el error propagado de la SE correspondiente al ratio de la SE en W+FR vs. la SE en W. En B y C los asteriscos muestran las diferencias significativas en la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra para cada concentración de inhibidor mediante la Prueba t de Student ($p < 0.05$).

Como se espera, las plantas sin inhibidor se alargan significativamente más en presencia de sombra ($p < 0.05$). En cambio, las plantas tratadas con inhibidor reprimen la respuesta a sombra (**Figura R2.3B, C**). En presencia de NFZ se observa una represión total de la respuesta cuando las plantas son totalmente albinas (500nM), pero

sorprendentemente también se observa una represión importante de la respuesta a sombra aun en concentraciones que no tienen casi impacto en la acumulación de clorofila (1 nM NFZ). En el caso de LIN, observamos una pérdida total de la respuesta aun cuando las plantas no son totalmente albinas. Esto sugiere que alteraciones moderadas en la función del cloroplasto pueden tener una gran influencia en la respuesta a sombra, mientras que el bloqueo total del desarrollo de cloroplastos genera una pérdida completa de la respuesta.

Para determinar si en presencia de los inhibidores existía también una disminución de la respuesta a sombra a nivel molecular, se analizó la expresión cuantitativa por qPCR de *PIL1*, *HFR1* y *YUC8*, genes de respuesta rápida a luz asociados a fitocromos que se inducen en presencia de sombra y que por lo tanto pueden utilizarse como marcadores del SAS (Ciolfi et al. 2013). Se crecieron plantas WT en presencia de NFZ, LIN o sin inhibidores durante 7 días en W y después se trataron con W+FR durante 1h, 2h y 4h (**Figura R2.4**). La respuesta más dramática fue la de *PIL1*, que en ausencia de inhibidores presenta una inducción de más de 100 veces tras la exposición a W+FR. Tras el pico de inducción a 1h, disminuye significativamente a 2 y 4h ($p<0.05$). En presencia de NFZ se observa una represión en los niveles de transcrito a 1h en comparación con el tratamiento sin inhibidor, seguida de una inducción significativa a las 2h ($p<0.05$). Estos resultados podrían interpretarse como un retardo en la inducción de la transcripción del gen *PIL1*. En presencia de LIN también observamos una disminución en los niveles de transcrito a 1h pero después estos no varían significativamente. En el caso de *HFR1*, observamos una inducción continua y significativa en sombra ($p<0.05$) cuando las plantas WT crecen en ausencia de inhibidores.

En presencia de NFZ o LIN también se observa una inducción en los niveles de transcrito, pero esta es significativamente menor a la observada en ausencia de inhibidores ($p<0.05$) y además no aumenta con el tiempo de tratamiento de sombra. En el caso de *YUC8*, en ausencia de inhibidor los niveles de transcrito se incrementan significativamente al cabo de 1h de exposición a W+FR ($p<0.05$) aunque después se mantienen invariables durante el tratamiento de sombra. En presencia de NFZ y LIN ocurre algo similar pero la inducción por sombra es mucho menor en comparación a la inducción sin inhibidor.



PCR cuantitativa (qPCR) de los niveles de transcrito de *PIL1*, *HFR1* y *YUC8* de plantas WT sembradas en presencia de 5µM de NFZ, 1mM LIN o en ausencia de inhibidor. Se crecieron durante 7 días en luz W y se trataron con W+FR durante 1, 2 y 4 horas. La enzima UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME (UBC) gen (At5g25760) se utilizó como normalizador. Las barras muestran el ratio de los niveles de transcrito en luz W+FR vs. niveles de transcrito en W para cada tiempo y inhibidor. Así mismo se muestra el SE propagado del ratio de la SE en W+FR vs. la SE en W correspondiente a cada tratamiento de 3 réplicas biológicas (n=3). Los asteriscos muestran las diferencias significativas en los niveles de transcrito en respuesta a sombra para cada inhibidor mediante la Prueba t de Student ($p<0.05$).

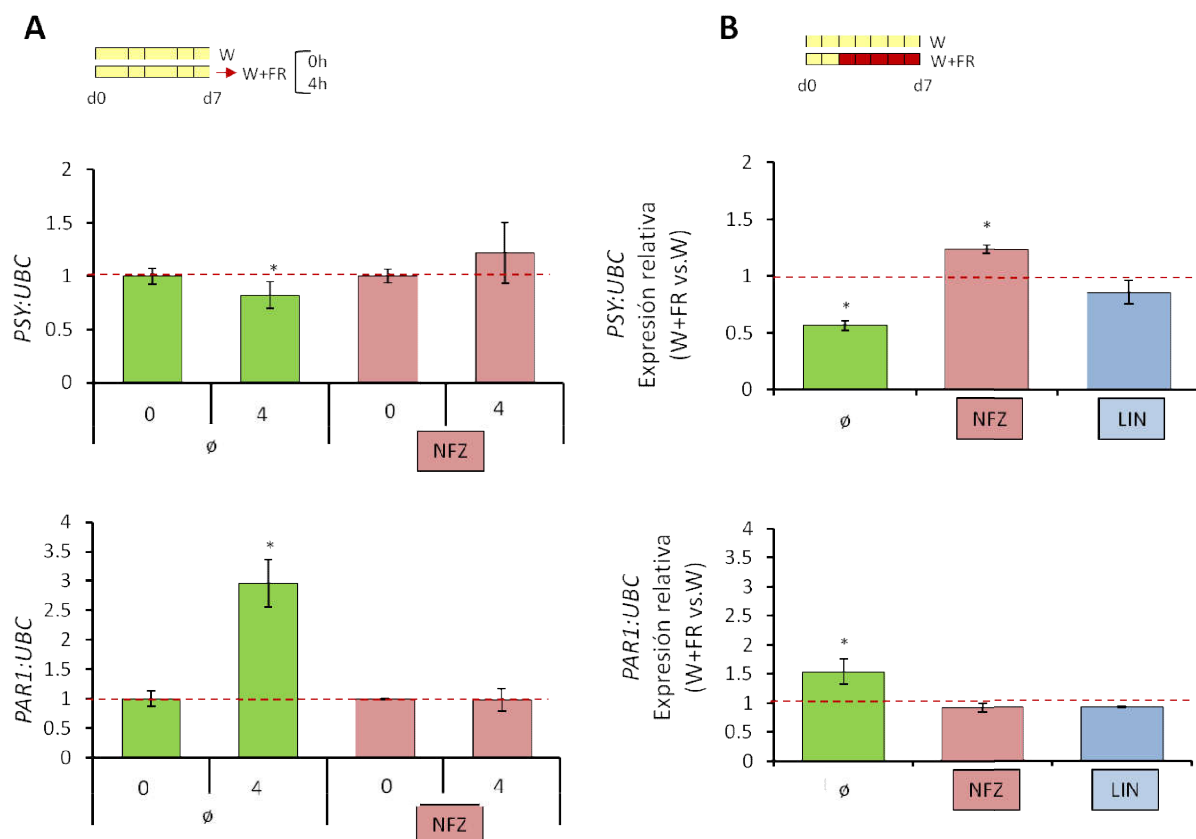


Figura R2.5 Respuesta molecular de genes implicados en la regulación de la carotenogénesis en presencia de inhibidores del cloroplasto.

A) PCR cuantitativa (qPCR) de los niveles de transcrito de *PAR-1* y *PSY* de plantas WT sembradas en presencia o ausencia de 5µM de NFZ. Se crecieron durante 7 días en luz W y se trataron con W+FR durante 4 horas. Las barras muestran el ratio de los niveles de transcrito en luz W+FR vs. niveles de transcrito en W para cada tiempo y inhibidor. Así mismo se muestra el SE propagado del ratio de la SE en W+FR vs. la SE en W correspondiente a cada tratamiento de 3 réplicas biológicas (n=3). B) Niveles de transcrito de *PAR-1* y *PSY* de plantas WT sembradas en presencia o ausencia de 5µM NFZ o 1mM LIN. Se crecieron durante 2 días en W y transferidas a 5 días en W o W+FR 5 días más. Las barras muestran el ratio de los niveles de transcrito en luz W+FR vs. niveles de transcrito en W para cada condición. Los asteriscos muestran las diferencias significativas en los niveles de transcrito en respuesta a sombra para cada concentración de inhibidor mediante la Prueba t de Student ($p<0.05$).

También se analizó la expresión de *PSY*, que al contrario que los demás genes analizados se reprime tras el tratamiento con W+FR (Bou-Torrent, Toledo-Ortiz & Ortiz-Alcaide 2015). En este caso, el tratamiento con NFZ impidió la represión de *PSY* tras la exposición a W+FR (**Figura R2.5A**), confirmando que el bloqueo del desarrollo de los cloroplastos inhibe la respuesta rápida a sombra a nivel molecular. Consistentemente, la expresión de *PAR1*, un regulador positivo directo de la expresión de *PSY* y negativo del SAS (Roig-Villanova et al. 2007; Bou-Torrent, Toledo-Ortiz & Ortiz-Alcaide 2015), también se vió atenuada en plantas tratadas con NFZ con respecto a controles no tratados tras la exposición durante 4h a sombra (**Figura R2.5A**). Posteriormente determinamos la respuesta molecular de estos dos genes relacionados con la síntesis de carotenoides (*PSY* y *PAR1*) a exposiciones continuadas a sombra en presencia de inhibidores. Para ello, crecimos plantas 2 días en W y luego las

transferimos a W o W+FR durante 5 días, siempre en presencia de NFZ o LIN (o sin inhibidores como control). Después se extrajo el RNA y se midieron los niveles de transcritos *PSY* y *PAR1* (**Figura R2.5B**). Como ocurría con los tratamientos cortos de sombra (**Figura R2.5A**), el tratamiento continuado resultó en una disminución de transcritos *PSY* y un aumento de *PAR1* en plantas no tratadas ($p < 0.05$) que no se producía en las tratadas con inhibidores (**Figura R2.5B**). Estos resultados confirman de nuevo que cuando los cloroplastos no son funcionales se reprime la respuesta a sombra tanto a nivel de elongación del hipocotilo como también a nivel molecular.

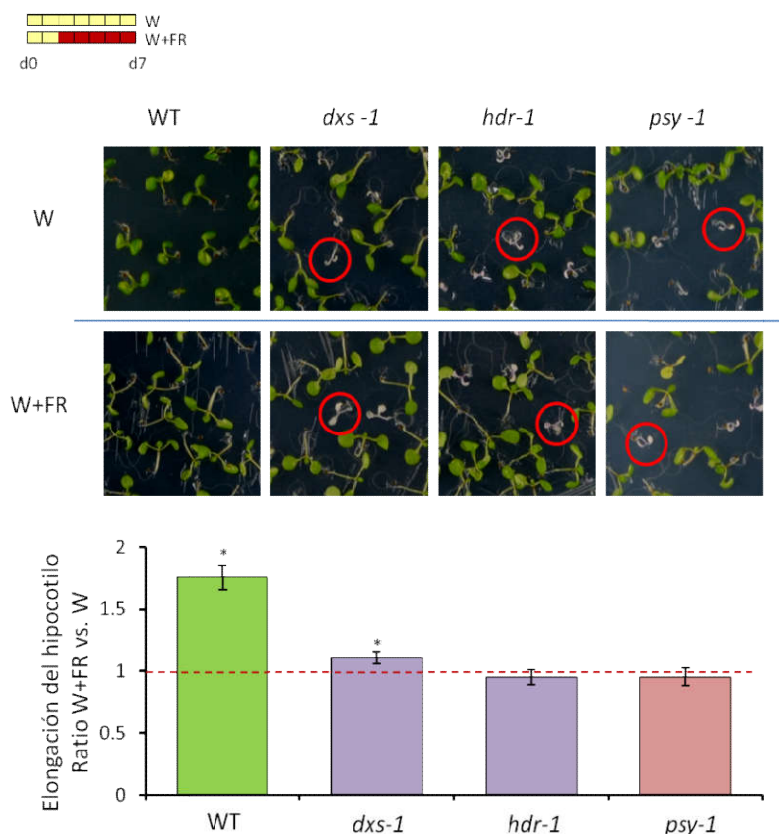


Figura R2.6 Elongación del hipocotilo en respuesta a sombra de mutantes del MEP y de carotenoides.

Elongación del hipocotilo en respuesta a sombra de los mutantes *dxs-1*, *hdr-1* y *psy-1*. Se sembraron plantas heterocigotas para estos genes durante 2 días en luz W y 5 días en luz W o W+FR y se seleccionaron aquellas azigotas para cada gen (albinas) para determinar la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra. Se representa el ratio de respuesta a W+FR para cada mutante, así como el SE propagado correspondiente de un total de 20 plántulas albinas ($n=20$) de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias significativas en la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra para cada mutante mediante Prueba t de Student ($p < 0.05$).

Para confirmar estos resultados a nivel genético, estudiamos la respuesta a sombra en diferentes mutantes de inserción de T-DNA con pérdida de función total de genes de la vía del MEP (*dxs-1*, *hdr-1*) y de la síntesis de carotenoides (*psy-1*), lo que sería equivalente a la utilización de los inhibidores FSM y NFZ, respectivamente (**Figura R2.1**). La **Figura R2.6** muestra el fenotipo albino de los mutantes homocigotos, que han de ser propagados en heterocigosis y que son claramente distinguibles del resto de

plantas azigotas o heterozigotas (verdes) en las poblaciones segregantes. Cuando se expusieron plantas WT, *dxs-1*, *hdr-1* y *psy-1* a un tratamiento largo de sombra simulada (2 días en W más 5 días en W o W+FR) se comprobó que la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra se encuentra fuertemente reprimida en los mutantes. Aunque en el mutante *dxs-1* las plantas presentan una ligera respuesta que resulta significativa ($p < 0.05$), en el resto de mutantes hay una represión total de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra. Estos resultados confirman las conclusiones obtenidas con los inhibidores en cuanto a la represión de la respuesta a sombra cuando la función de los cloroplastos está comprometida.

2.1.3 Las plantas albinas no son constitutivamente hiposensibles a luz

Podría ser que la ausencia de elongación del hipocotilo en respuesta a sombra sea debida a que las plantas albinas tienen comprometida la capacidad para alargarse, ya que tienen un déficit energético. Para descartar esta posibilidad, se realizó un experimento administrando diferentes hormonas activadoras del crecimiento del hipocotilo al medio de cultivo de plantas WT tratadas o sin tratar con NFZ, así como de mutantes *hdr-1*, y se midió su capacidad de elongación al cabo de 7 días en W (**Figura R2.7**). En concreto, se administraron las hormonas epibrasinolido (EBL, un brasinoesteroide), ácido giberélico (GA_3 , una giberelina), y picloram (PIC, una auxina sintética). Según nuestros resultados, en presencia de las hormonas tanto las plantas no tratadas (verdes) como las tratadas con NFZ o las mutantes *hdr-1* (albinas) son capaces de alargarse (**Figura R2.7**). Este resultado demuestra que la represión de la respuesta a sombra de las plantas albinas en términos de alargamiento del hipocotilo no puede explicarse por una disminución en su capacidad de alargamiento. De esto se deduce que el bloqueo de la fotosíntesis en el cloroplasto conlleva alteraciones en la percepción de la luz y/o en las cascadas de transducción de la señal lumínica (en este caso, de la señal de sombra) no en la capacidad de alargamiento.

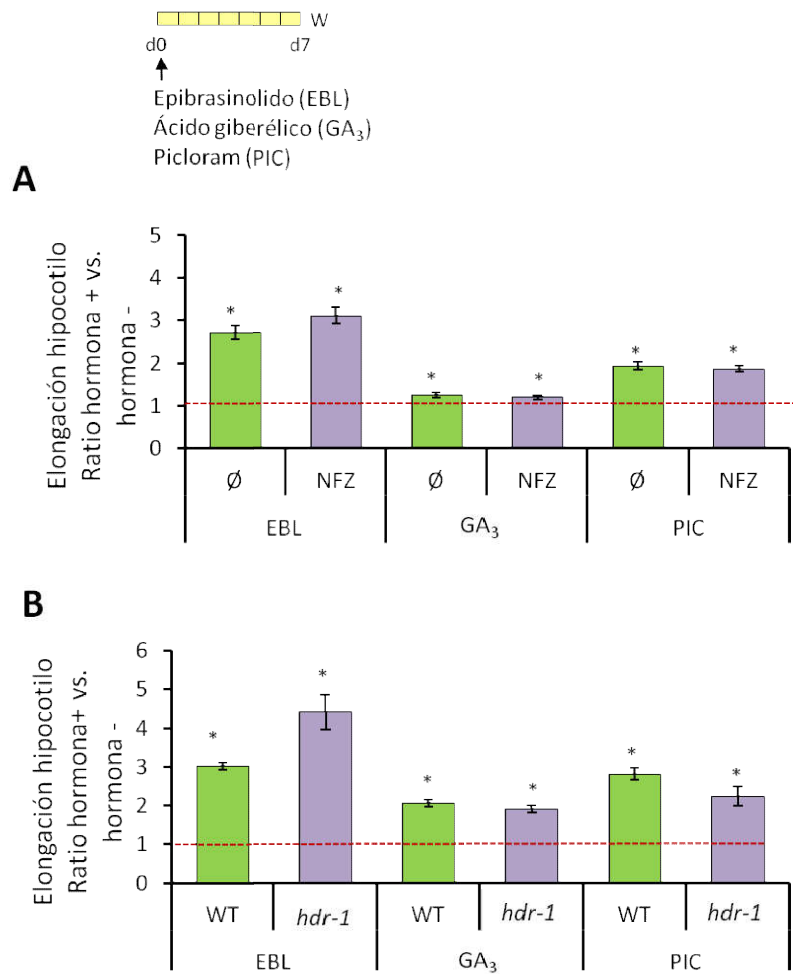


Figura R2.7 Elongación del hipocotilo en presencia de hormonas de crecimiento.

A) Plántulas WT sembradas en presencia o ausencia de 1μM EBL, 10μM GA₃ o 5μM PIC y en presencia o ausencia de NFZ. Se crecieron durante 7 días en W. B) Plántulas WT y *hdr-1* se crecieron en luz W durante 7 días en las mismas condiciones que en A pero en ausencia de NFZ. En ambas gráficas se representa la elongación del hipocotilo como el ratio de longitud del hipocotilo de plantas crecidas con hormona vs. la longitud del hipocotilo de plantas sin tratamiento hormonal para cada condición y el SE propagado de 25 plántulas (n=25) de un experimento representativo. Los asteriscos muestran las diferencias significativas de la elongación del hipocotilo mediante la Prueba t de Student (p<0.05).

Otra posibilidad para explicar por qué las plantas albinas muestran una pérdida del alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra es que estas sean constitutivamente hiposensibles a luz y por tanto necesiten un mayor estímulo lumínico para activar los mecanismos moleculares de percepción y/o transducción de la señal de luz que llevan a la elongación en respuesta a sombra. Para ensayar esta posibilidad, se crecieron plantas WT durante 7 días en presencia o ausencia de NFZ en el interior de cajas con diferentes filtros en la parte superior para modular la cantidad

de luz del espectro PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) incidente. Posteriormente se midió la elongación del hipocotilo (**Figura R2.8**). Como resultado, parecen no observarse grandes diferencias entre el alargamiento del hipocotilo de las plantas tratadas o sin tratar con inhibidor. Aunque las plantas tratadas con NFZ tienen tendencia a ser más cortas, es probable que este fenotipo derive de la menor capacidad de las plantas albinas para alargarse. Esta conclusión está apoyada por el hecho de que las plantas tratadas con NFZ son ligeramente más cortas que las no tratadas aún en ausencia de luz (**Figura R2.8**). Por lo tanto, concluimos que la ausencia de respuesta a W+FR de las plantas albinas no es debida a una alteración constitutiva de la sensibilidad de la luz. En conjunto, nuestros resultados indican que la presencia de cloroplastos fotosintéticamente activos es necesaria para percibir y/o transducir la señal de sombra que resulta en cambios en la expresión génica y finalmente en el alargamiento del hipocotilo.

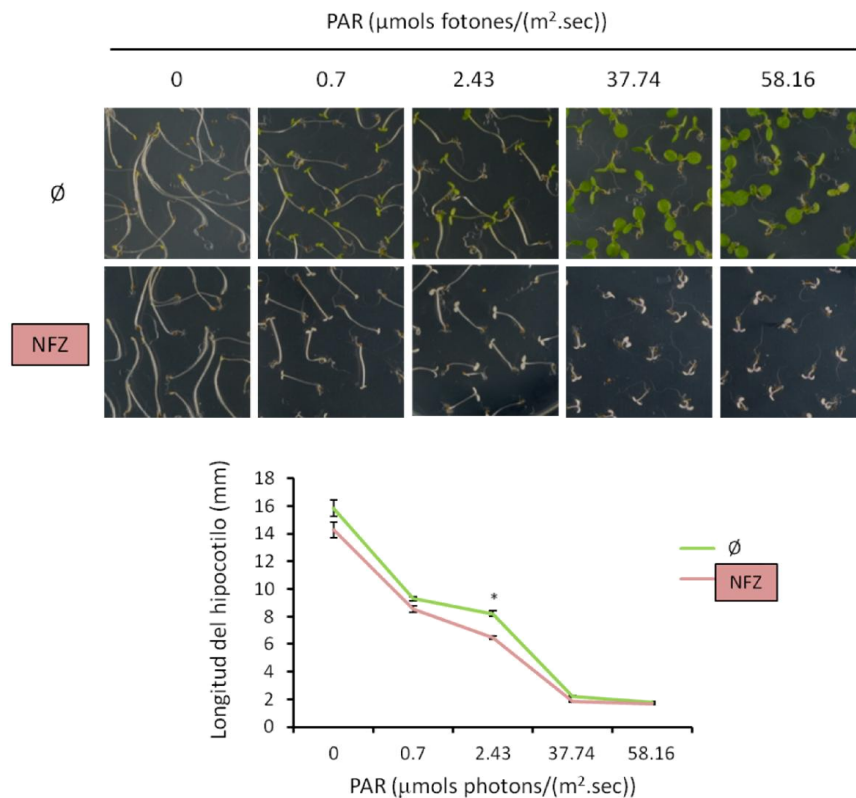


Figura R2.8 Sensibilidad de plántulas a diferentes intensidades lumínicas en presencia o ausencia de cloroplastos funcionales.

Longitud del hipocotilo de plántulas WT crecidas en presencia de diferentes intensidades lumínicas en presencia o ausencia de NFZ. Se representa la media de la elongación para cada tratamiento y el SE de un total de 30 plantas ($n=30$) de un experimento representativo. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre la longitud del hipocotilo en ausencia de inhibidor y la longitud en presencia de inhibidor calculada a partir de la Prueba t de Student ($p<0.05$).

2.1.4 La ausencia de cloroplastos funcionales desacelera la inactivación del fitocromo B en respuesta a sombra

Aunque los resultados mostrados indican que la ausencia de cloroplastos funcionales no parece afectar la sensibilidad de la planta a luz durante la desetiología, sí podría tener un papel específicamente en la respuesta a señales de sombra. Como se ha comentado anteriormente, phyB es el principal fitocromo implicado en el SAS y además es fotoestable en luz blanca, lo que hace que fusiones a GFP expresadas constitutivamente (por ejemplo, con la construcción *35S:phyB-GFP*) sean fácilmente observables mediante microscopía confocal. Las fusiones phyB-GFP son útiles además para analizar el estado de fotoactivación de este fotoreceptor, debido a que se localiza de forma diferencial dependiendo de su estado de activación. La fotoactivación de phyB en luz W o R provoca su localización en corpúsculos nucleares (*photobodies*, supuestamente los lugares donde tiene lugar la transducción de la señal de luz) (Yamaguchi et al. 1999). Su inactivación en oscuridad o al irradiar con sombra (W+FR) o con luz FR monocromática provoca la desaparición de los corpúsculos, deslocalizándose la fluorescencia por el núcleo (**FIGURA R2.9**). Si la señal inactivadora persiste, el phyB es exportado al citoplasma (Yamaguchi et al. 1999; Chen et al. 2003).

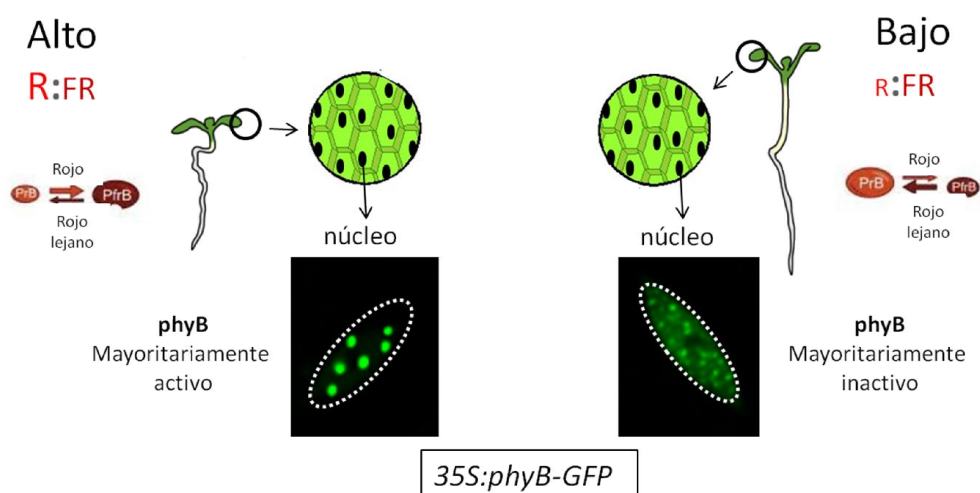


Figura R2.9 Representación del patrón de distribución de los corpúsculos nucleares "photobodies" del *35S: phyB-GFP* en función de la presencia o ausencia de sombra.

En presencia de luz enriquecida en R (elevado ratio R:FR) el phyB se presenta mayoritariamente en su isoforma activa. Como consecuencia la construcción *35S:phyB-GFP* se acumula en corpúsculos en el interior del núcleo. Por el contrario, en presencia de sombra, cuando la luz presenta un enriquecimiento mayor en FR (ratio R:FR disminuido) en phyB se presenta mayoritariamente en su isoforma inactiva. Como consecuencia la construcción *35S:phyB-GFP* presenta pequeños corpúsculos difuminados en el núcleo.

Para estudiar si la desactivación del phyB en respuesta a sombra esta modulada por cloroplastos activos, se crecieron plantas transgénicas *35S:phyB-GFP* durante 7 días en

W en presencia o ausencia de NFZ o LIN y después se simuló la exposición a sombra irradiando con luz FR durante 5 minutos directamente en el microscopio. Posteriormente se mantuvieron las plantas en oscuridad, haciendo un seguimiento de la localización de la fluorescencia de phyB-GFP a diferentes tiempos mediante microscopía confocal. Tal y como se puede observar en la (**Figura R2.10**), en plantas verdes tratadas con FR la mayoría de los corpúsculos nucleares desaparecen poco después del tratamiento (20- 30 min). En cambio en presencia tanto de NFZ como de LIN, estos corpúsculos se mantienen durante más tiempo.

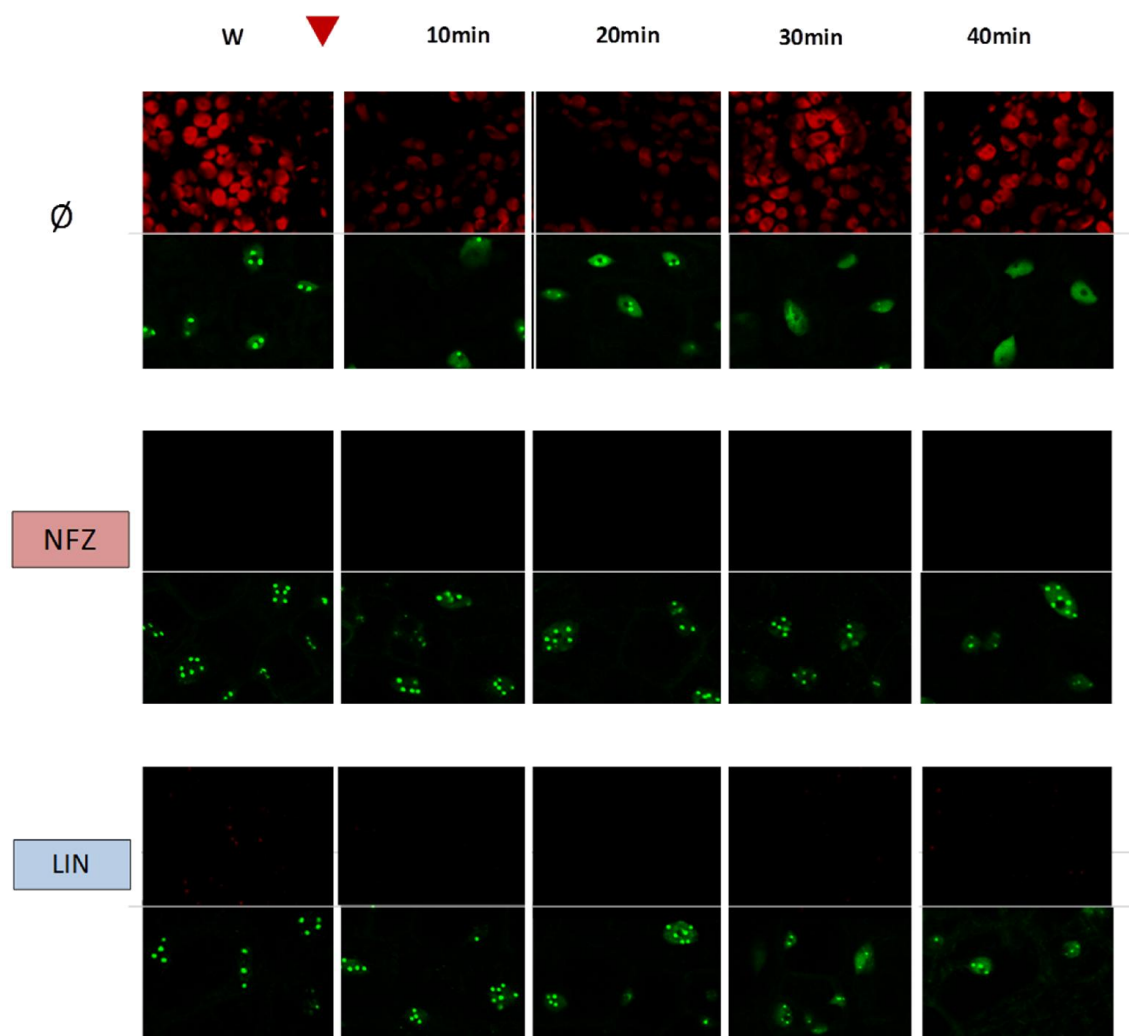


Figura R2.10 Patrón de inactivación del phyB en presencia o ausencia de cloroplastos funcionales

Se crecieron plantas 35S:*phyB-GFP* en presencia o ausencia de 5 μ M NFZ o 1mM LIN durante 7 días en W a 21°C. Posteriormente, se irradiaron durante 5 minutos con FR y se realizaron fotografías sucesivas mediante microscopía confocal de la región apical del hipocotilo en presencia de oscuridad a 10, 20, 30 y 40 minutos de un total de 10 muestras por cada punto (n=10). Se presentan fotografías representativas de cada punto.

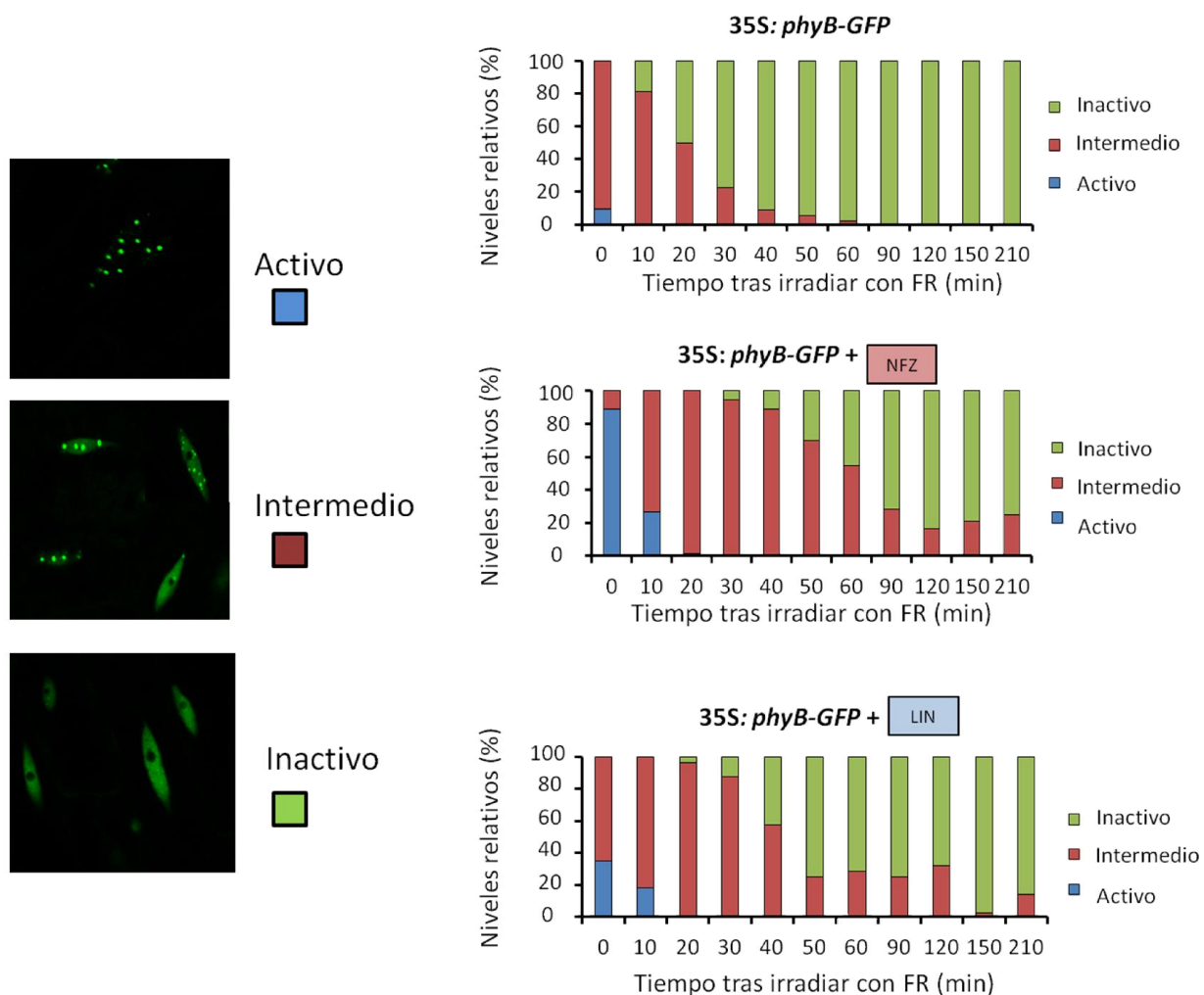


Figura R2.11 Resultados cuantitativos de la inactivación del phyB en presencia o ausencia de cloroplastos funcionales

Se crecieron plantas 35S::phyB-GFP durante 7 días en W en medios suplementados con los inhibidores indicados, según la Figura R2.10. Se irradiaron como en la Figura R2.10 y se realizaron fotografías en oscuridad mediante microscopía confocal en los tiempos indicados. Posteriormente, se clasificó el estado de actividad de los núcleos: en núcleos activos, donde se observan claramente los corpúsculos nucleares sin ningún fondo; intermedios, donde se observan los corpúsculos nucleares y una fluorescencia de fondo; e inactivos, donde se observa solo la fluorescencia de fondo. En las gráficas se representa el % de núcleos de un total de 90 núcleos contabilizados por cada punto de tiempo y condición pertenecientes a 10 muestras biológicas (n=10) recogidas en 3 experimentos independientes.

La cuantificación de este fenotipo se llevó a cabo clasificando los núcleos que aparecían en cada imagen en 1) phyB-activos (con los típicos corpúsculos nucleares y sin ninguna fluorescencia de fondo), 2) phyB-intermedios (con corpúsculos nucleares pero también fluorescencia de fondo) y 3) phyB-inactivos (sin corpúsculos nucleares, solo con fluorescencia nuclear de fondo) (**Figura R2.11**). Para cada tiempo se analizaron un total de 90 núcleos provenientes de 10 individuos diferentes y de tres experimentos independientes. Según nuestros resultados, antes del tratamiento con FR la mayoría de los núcleos son del tipo phyB-intermedio en plantas verdes (control) y

albinas tratadas con LIN, mientras que las tratadas con NFZ muestran una mayor proporción de núcleos phyB-activos (**Figura R2.11**). Tras la irradiación con luz FR, la proporción de núcleos phyB-inactivos aumenta rápidamente en las plantas control, llegando el 50% a los 20 min y al 100% a los 90 min. Sin embargo, en las plantas tratadas con inhibidores la desactivación de phyB-GFP es mucho más lenta. A los 20 min tras el tratamiento simulador de sombra, casi no hay núcleos del tipo phyB-inactivo en estas plantas albinas, mientras que a los 90 min la proporción es de sólo un 25%. A los 210 min, todavía se apreciaban núcleos phyB-intermedios en las plantas tratadas con NFZ o LIN (**Figura R2.11**). De estos resultados se deduce que la fotoconversión del fitocromo hacia la forma inactiva tras la percepción de la señal de sombra (es decir, de una mayor proporción de FR) se ve claramente retardada en el tiempo cuando se bloquea el desarrollo de cloroplastos activos (**Figura R2.11**). Por lo tanto, estos resultados apoyan la hipótesis de que el estado funcional de los cloroplastos modula la actividad de los fitocromos en respuesta a sombra.

2.2 La respuesta a sombra en plantas albinas está reprimida por HY5 y carotenoides

2.2.1 Búsqueda de mutantes capaces de responder a sombra sin cloroplastos funcionales.

En este punto nos propusimos investigar el mecanismo molecular responsable de la comunicación entre cloroplastos y señalización de luz. Para identificar factores reguladores de este proceso, nos planteamos realizar un búsqueda en la bibliografía de mutantes afectados en la percepción y señalización de luz así como en la señalización retrógrada que después utilizaríamos para comprobar si eran capaces de responder a sombra aun en presencia de cloroplastos disfuncionales. Como resultado de la búsqueda bibliográfica se seleccionaron mutantes deficientes en GUN1 un integrador central de las vías de señalización retrógrada; (Koussevitzky et al. 2007; Ruckle et al. 2007; Larkin & Ruckle 2008; Nott et al. 2006), GUN2/HY1 (incapaz de producir el cromóforo de los fitocromos; (Muramoto et al. 1999; Vinti et al. 2000; Mochizuki et al. 2001), PIFq; (Leivar et al. 2008a), y HY5 (Oyama et al. 1997; Song et al. 2008; Ruckle et al. 2007; Larkin & Ruckle 2008; Kindgren et al. 2012b; Ruckle & Larkin 2009) (**Figura R2.12**). Estos mutantes junto con el WT se crecieron en presencia de NFZ durante 2 días en W, se pasaron a W o W+FR durante 5 días más, y posteriormente se midieron los hipocotilos para cuantificar la respuesta a sombra.

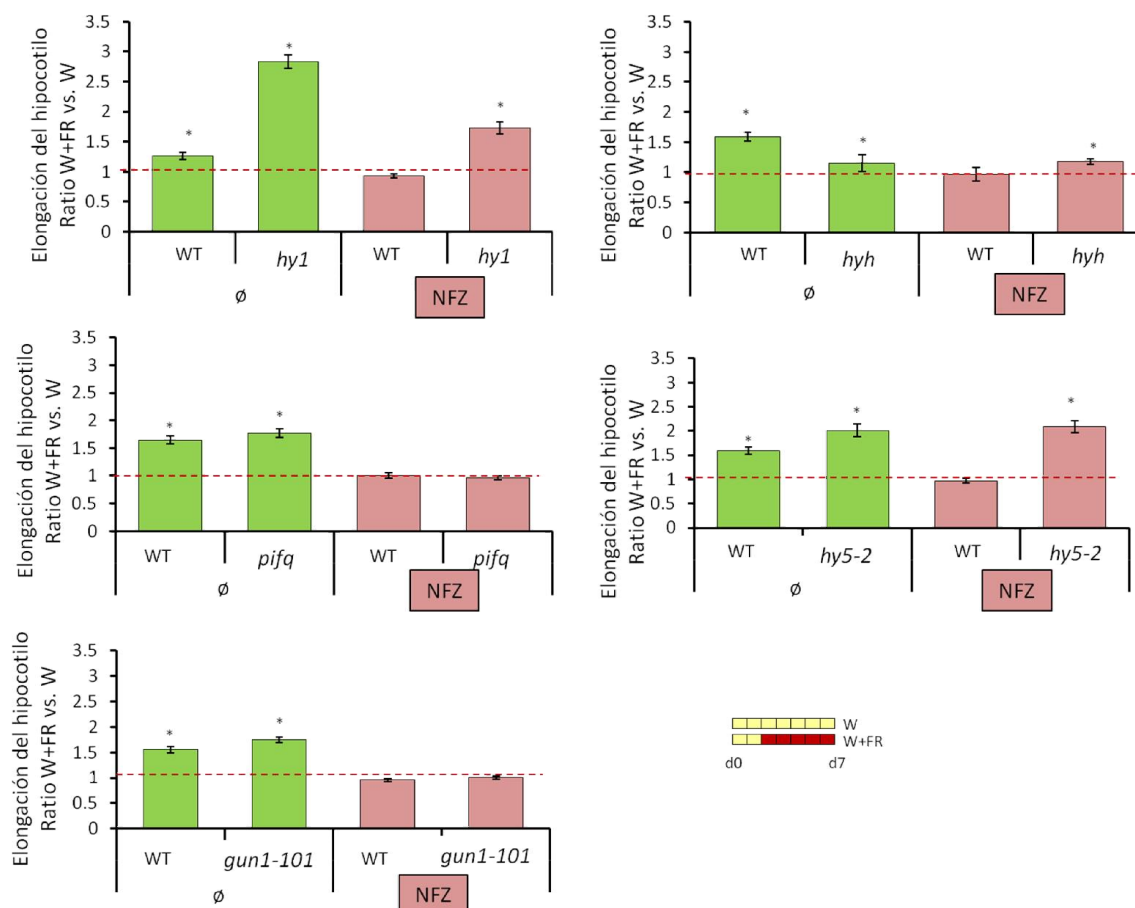


Figura R2.12 Caracterización de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra en ausencia de cloroplastos funcionales, en el caso de mutantes afectados en las vías de percepción y señalización lumínica y de señal retrógrada.

Elongación del hipocotilo en respuesta a sombra de los mutantes *hy1*, *pifq*, *hyh*, *hy5-2* y *gun1-101* sembrados en ausencia o presencia de 5 μ M de NFZ. Se crecieron durante 2 días en luz W y 5 días en luz W o W+FR y se midió la longitud del hipocotilo. Se representa el ratio de respuesta a W+FR para cada mutante, así como el SE propagado correspondiente de un total de 25 plántulas (n=25) de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias significativas en la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra para cada mutante mediante la Prueba t de Student ($p < 0.05$).

El mutante *hy1* (Rodríguez-Concepción et al. 2004) presenta una mayor elongación del hipocotilo en respuesta a sombra que el WT sin inhibidor y una conservación parcial de este alargamiento en presencia de NFZ. Este fenotipo podría ser debido a un déficit en la producción del cromóforo de los fitocromos, ya que su fenotipo recuerda al observado en el mutante de *phyA* en presencia de FSM (**Figura R2.2**). Por otro lado, los mutantes *pifq* y *gun1-101* (Ruckle et al. 2007) presentan un fenotipo WT de respuesta a sombra tanto en ausencia como en presencia de NFZ. Por lo tanto, la ausencia de PIF1, PIF3, PIF4 o PIF5 no parece interferir en la respuesta de alargamiento tras la exposición a W+FR, y lo mismo se puede decir para GUN1. Como contraste, el mutante *hy5-2* presenta una inducción significativa ($p < 0.05$) de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra en plantas verdes, y es capaz de mantener dicha respuesta aun en

presencia de NFZ. Esto sugiere su implicación en la represión de la respuesta a sombra incluso en presencia de NFZ. De hecho HY5 es un factor de transcripción represor de la elongación del hipocotilo durante la desetiolación (Oyama et al. 1997) y actúa como punto de convergencia entre vías de señalización de luz y otras vías de señalización, entre ellas, las vías de señal retrógrada (Ruckle & Larkin 2009; Larkin & Ruckle 2008; Ruckle et al. 2007). En *Arabidopsis*, algunas de las respuestas en las que está implicado HY5 son también reguladas por su homólogo HYH. En concreto, ambos factores de transcripción están implicados en la respuesta del phyB (Sellaró et al. 2009). Para estudiar si HYH podía participar en la interacción entre respuesta a sombra y señalización retrógrada, utilizamos el mutante *hyh* (Delker et al. 2014). En el caso de este mutante observamos que responde menos que el WT al tratamiento con W+FR cuando los cloroplastos son funcionales, mientras que responde más en presencia de NFZ (**Figura R2.12**). Por tanto, su papel en estos procesos debe ser complejo y distinto al de HY5. En resumen, estos resultados sugieren que una vía retrógrada independiente de GUN1 pero dependiente de HY5 reprime la elongación del hipocotilo en plántulas albinas expuestas a sombra.

2.2.2 HY5 reprime la elongación del hipocotilo antes y después de la exposición a sombra

Con tal de caracterizar mejor el papel de HY5 en la regulación del alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra se utilizaron líneas *35S:HA-HY5[hy5-Ks50]* que sobreproducen constitutivamente la proteína HY5 fusionada a un epítipo HA en fondo *hy5-Ks50* (Lee & He 2007). Además, se generaron plantas transgénicas en las que la actividad HY5 podía inducirse. Para ello se fusionó HY5 a un dominio GR (receptor de glucocorticoides) que mantiene la proteína de fusión HY5-GR en el citosol y solo la dirige al núcleo en presencia de un glucocorticoide. Las plantas no sintetizan glucocorticoides de forma natural, así que la localización nuclear de HY5-GR y por tanto la actividad HY5 dependen del tratamiento con un glucocorticoide exógeno, como dexametasona (Dex). La construcción *35S:HY5-GR* se introdujo en plantas mutantes *hy5-2* y se escogió la línea transformada *35S:HY5-GR[hy5-2]* que mostró la mejor complementación del fenotipo de hipocotilo en W y en presencia de Dex (**Figura R2.13A**). Posteriormente, se compararon los niveles de transcritos de *HY5* en las líneas *35S:HA-HY5[hy5-Ks50]* y *35S:HY5-GR[hy5-2]* por PCR cuantitativa (**Figura R2.13B**). Mientras que la línea inducible *35S:HY5-GR[hy5-2]* crecida en presencia de dexametasona presenta 25 veces más cantidad de transcritos de *HY5* que el WT, la línea sobreexpresora *35S:HA-HY5[hy5-Ks50]* presenta 370 veces más de transcritos en comparación con el silvestre.

A continuación, se sembraron plantas WT, mutantes *hy5-2* y líneas transgénicas *35S:HA-HY5[hy5-Ks50]* y *35S:HY5-GR[hy5-2]* y se compararon las respuestas de elongación del hipocotilo tras crecerlas 2 días con W más 5 días con W o W+FR (**Figura**

R2.13C). Según nuestros resultados, el alargamiento del hipocotilo tras el tratamiento de sombra se correlaciona con los niveles de HY5. Cuando HY5 no está presente, el alargamiento es mayor que en las plantas WT, mientras que cuando HY5 está presente en exceso (plantas *35S:HA-HY5[hy5-Ks50]*) la respuesta está muy atenuada aunque sigue siendo significativa ($p < 0.05$) (**Figura R2.13C**). En el caso de la línea *35S:HY5-GR[hy5-2]*, con más transcritos para HY5 que el WT pero menos que la línea *35S:HA-HY5[hy5-Ks50]*, la presencia de Dex también reprime la respuesta de alargamiento. Por lo tanto, con estos resultados concluimos que HY5 actúa como represor de la elongación del hipocotilo tanto en W como en respuesta a W+FR, y que esta represión es dosis-dependiente.

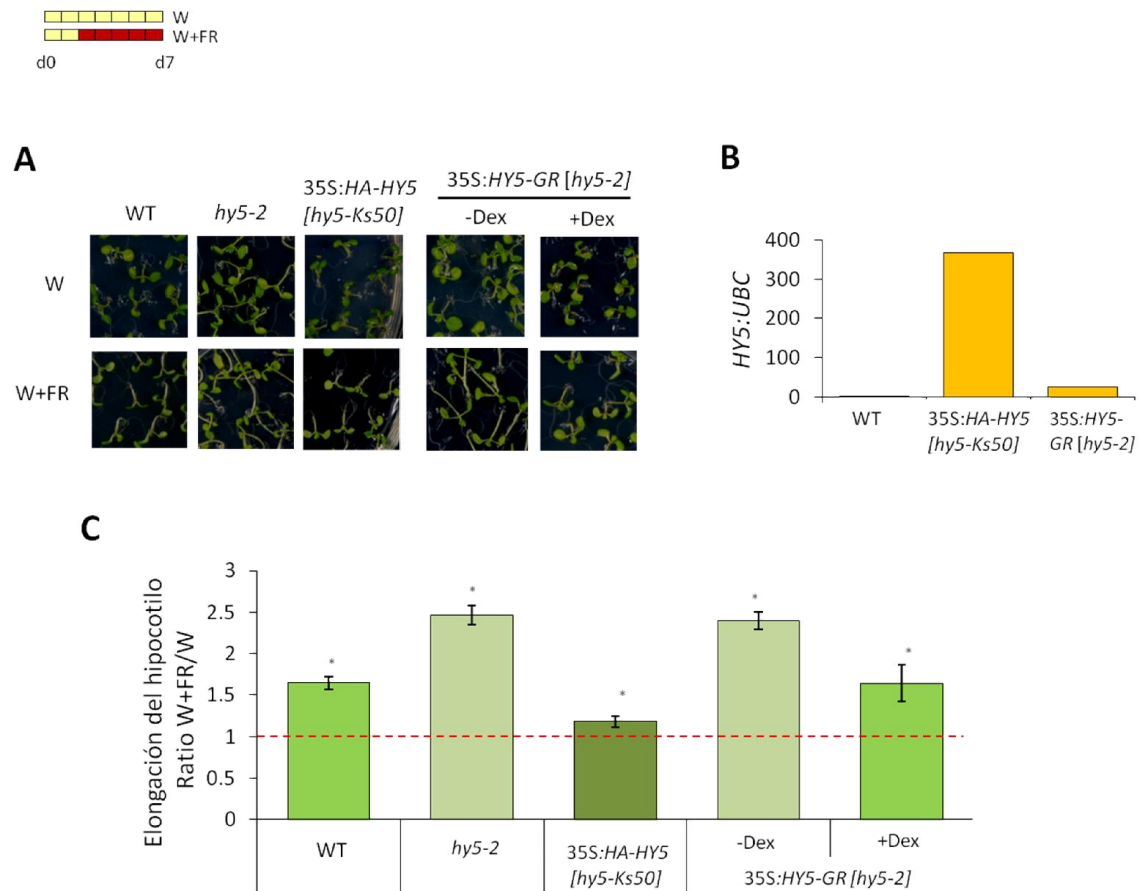


Figura R2.13 Implicación de HY5 en la regulación de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra.

A) Fotografías de plántulas WT, *hy5-2*, *35S:HA-HY5 [hy5-Ks50]* y la línea inducible con dexamentasona (Dex) *35S:HY5-GR [hy5-2]* crecidas durante 2 días en W y después transferidas a W o W+FR 5 días más. Las líneas inducibles se sembraron en presencia o ausencia de 2μM Dex desde el día 0 para inducir la localización nuclear de la proteína de fusión. B) Niveles de transcritos de HY5 relativos al WT de plantas sobreexpresoras de HY5 *35S:HA-HY5 [hy5-Ks50]* y *35S:HY5-GR [hy5-2]* crecidas durante 7 días en W en presencia de Dex. C) Elongación del hipocotilo en respuesta a W+FR de las mismas líneas junto con el SE propagado de 60 plántulas n=60 de un experimento representativo. Los asteriscos representan diferencias significativas en elongación del hipocotilo en respuesta a sombra mediante la Prueba t de Student ($p < 0.05$).

2.2.3 La respuesta a sombra de plantas sin cloroplastos ni HY5 requiere un bloqueo específico de la síntesis de carotenoides

El efecto represor de HY5 sobre el alargamiento del hypocotilo en respuesta a sombra es especialmente evidente cuando la síntesis de carotenoides está bloqueada en presencia de NFZ (**Figura R2.12**). Con tal de determinar la especificidad de esta respuesta, se decidió comprobar si también ocurre con otros inhibidores del desarrollo fotosintético del cloroplasto. Para ello, crecimos plantas WT y *hy5-2* en medios suplementados con diferentes inhibidores y las tratamos con W o W+FR durante 5 días. Concretamente, suplementamos el medio de crecimiento con inhibidores de la ruta del MEP como CLM y FSM, de la ruta específica de síntesis de carotenoides como NFZ y 2-(4 clorofeniltio) trietilamina (CPTA), y de la síntesis de proteínas en el cloroplasto como LIN y CAP (**Figura R2.1**). Todos estos inhibidores se usaron a concentraciones que producían plantas totalmente albinas, para estar seguros de que los tratamientos eran comparables. Los resultados (**Figura R2.14A**) muestran que las plantas mutantes únicamente muestran una respuesta a sombra significativa ($p < 0.05$) cuando crecen en presencia de NFZ y CPTA, ambos inhibidores de la síntesis de carotenoides. Para demostrar si la respuesta de *hy5-2* es realmente específica de la ausencia de carotenoides, se expusieron plantas WT y *hy5-2* a W o W+FR en presencia de diferentes combinaciones de inhibidores. En concreto, suplementamos el medio con NFZ y con inhibidores que bloquean la respuesta de *hy5-2* a sombra al bloquear la ruta del MEP (NFZ+FSM y NFZ+CLM, **Figura R2.14B**) o la expresión del plastoma (NFZ+LIN; **Figura R2.14C**). En todos los casos, aunque en grados ligeramente distintos, la presencia de NFZ permitió restablecer la respuesta a sombra de plantas mutantes albinas. De esta forma se confirma que la respuesta de *hy5-2* es dependiente exclusivamente del tratamiento con NFZ, que supuestamente conlleva la ausencia de carotenoides.

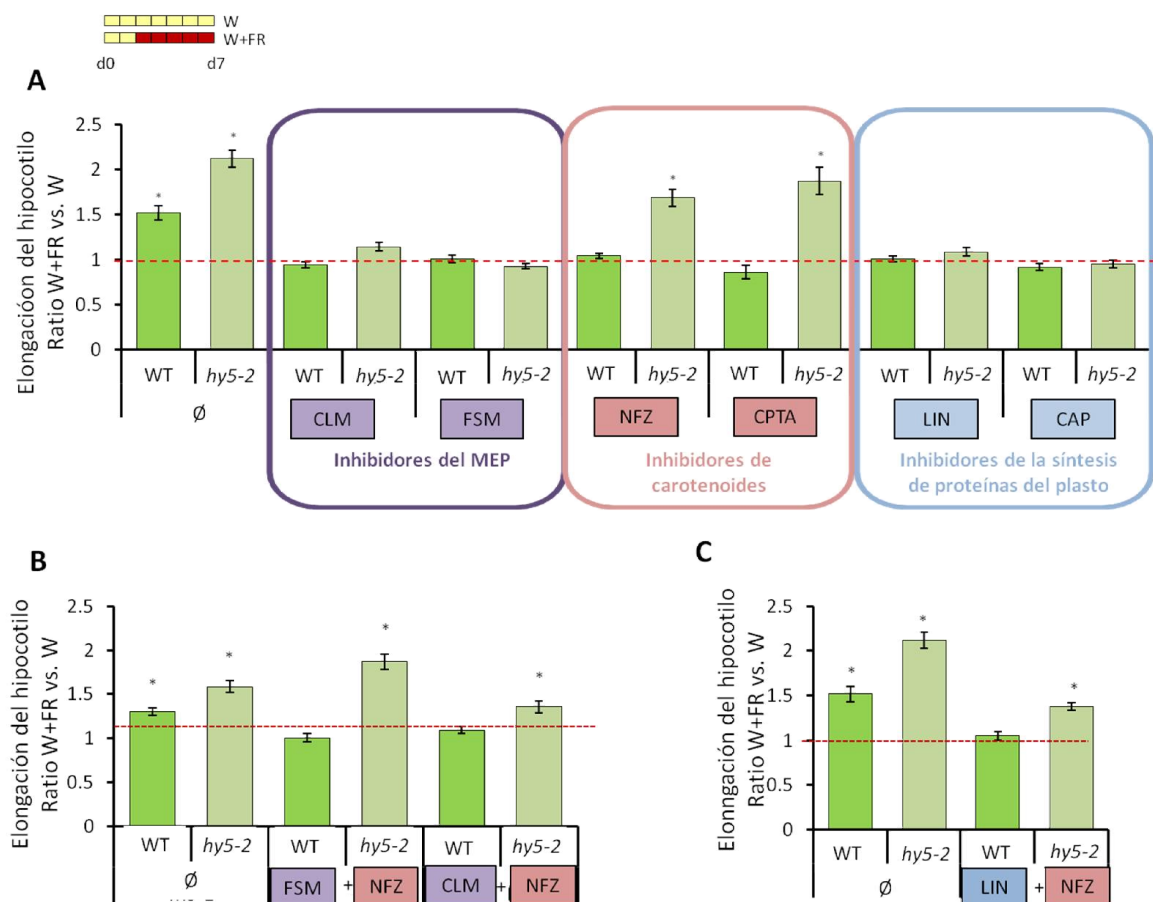


Figura R2.14 Efecto corepresor de los carotenoides y HY5 en la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra en presencia de inhibidores del cloroplasto.

A) Elongación del hipocotilo en respuesta a sombra de plantas WT y *hy5-2* sembradas en ausencia o presencia de inhibidores del desarrollo del cloroplasto, debido a un bloqueo específico de la vía del MEP (50 μ M clomazona CLM o 500 μ M fosmidomicina FSM), la vía de los carotenoides (5 μ M norflurazon NFZ o 25 μ M 2- (4chlorophenylthio) triethylamine CPTA) o la síntesis de proteínas del plastoma (1mM lincomicina LIN o 50 μ M de cloramfenicol CAP). Se crecieron durante 2 días en luz W y 5 días en luz W o W+FR y se midió la longitud del hipocotilo. B) Elongación del hipocotilo en respuesta a sombra de plantas WT y *hy5-2* crecidas según A en presencia de inhibidores de la vía del MEP junto con un inhibidor de la vía de los carotenoides obteniendo FSM+NFZ y CLM+NFZ. Se utilizaron las mismas concentraciones de cada inhibidor que en A. C) Elongación del hipocotilo en respuesta a sombra de plantas WT y *hy5-2* crecidas según A en presencia de un inhibidor de la vía de la síntesis de proteínas del cloroplasto LIN junto con un inhibidor la vía de los carotenoides NFZ. Se utilizaron las mismas concentraciones de cada inhibidor que en A. Las barras en A, B y C indican el ratio de respuesta a W+FR para cada línea y tratamiento, así como el SE propagado correspondiente de un total de 30 plántulas (n=30) de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias significativas en la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra para cada línea y tratamiento mediante la Prueba t de Student ($p < 0.05$).

El próximo paso fue asegurarse de la especificidad del NFZ frente a otros inhibidores en cuanto al bloqueo de la producción de carotenoides. Para ello, realizamos un análisis de pigmentos mediante HPLC de plantas WT y *hy5-2* crecidas en medio con

NFZ, FSM o LIN durante 7 días en W (**Figura R2.15**). A nivel visual ya se aprecia que el tratamiento con NFZ genera plantas de un color más blanco que en el caso de FSM y LIN (que producen plantas más amarillentas). El análisis por HPLC confirmó que el mutante *hy5-2* acumula un 20% menos de clorofila y carotenoides respecto al WT, tal y como está descrito en la bibliografía (Oyama et al. 1997). En ambos casos (WT y mutante), el tratamiento con FSM o LIN produjo una disminución muy considerable en la cantidad de carotenoides en comparación a las plantas sin tratamiento con inhibidor (**Figura R2.15**). En ambos casos (FSM y LIN), encontramos un perfil metabólico bastante comparable, con reducciones similares en los niveles de los carotenoides normalmente detectados en tejido fotosintético, como β -caroteno, neoxantina, violaxantina y luteína. En el caso del tratamiento con FSM, el bloqueo de la ruta del MEP impediría en principio la síntesis de los precursores necesarios para la producción de carotenoides, IPP y DMAPP. Sin embargo, es posible que ante el bloqueo de esta ruta la planta reaccione activando el importe de IPP y DMAPP desde el citosol, lo que podría ser suficiente para que puedan acumularse los carotenoides detectados (Dudareva et al. 2005) (**Figura R2.15**). Cuando analizamos el perfil metabólico de las plantas tratadas con NFZ no pudimos detectar ninguno de los carotenoides que sí detectábamos con FSM o LIN (**Figura R2.15**). En su lugar, observamos la acumulación de fitoeno, el intermediario anterior al bloqueo ejercido por NFZ (**Figura R2.15**). Estos resultados confirman que el tratamiento con NFZ es el único que impide la síntesis y acumulación de carotenoides por debajo de fitoeno, y que por lo tanto son estos carotenoides (o productos derivados) los que reprimen la capacidad del mutante *hy5-2* para alargarse en respuesta a sombra cuando los cloroplastos no son funcionales. Dado que el tratamiento con CPTA (que bloquea la ruta a nivel de licopeno) también impide la respuesta a sombra de las plantas WT pero no la de *hy5-2* (**Figura R2.14**), se puede concluir que la capacidad del mutante para alargarse en respuesta a W+FR está reprimida por un carotenoide (o derivado) por debajo de licopeno.

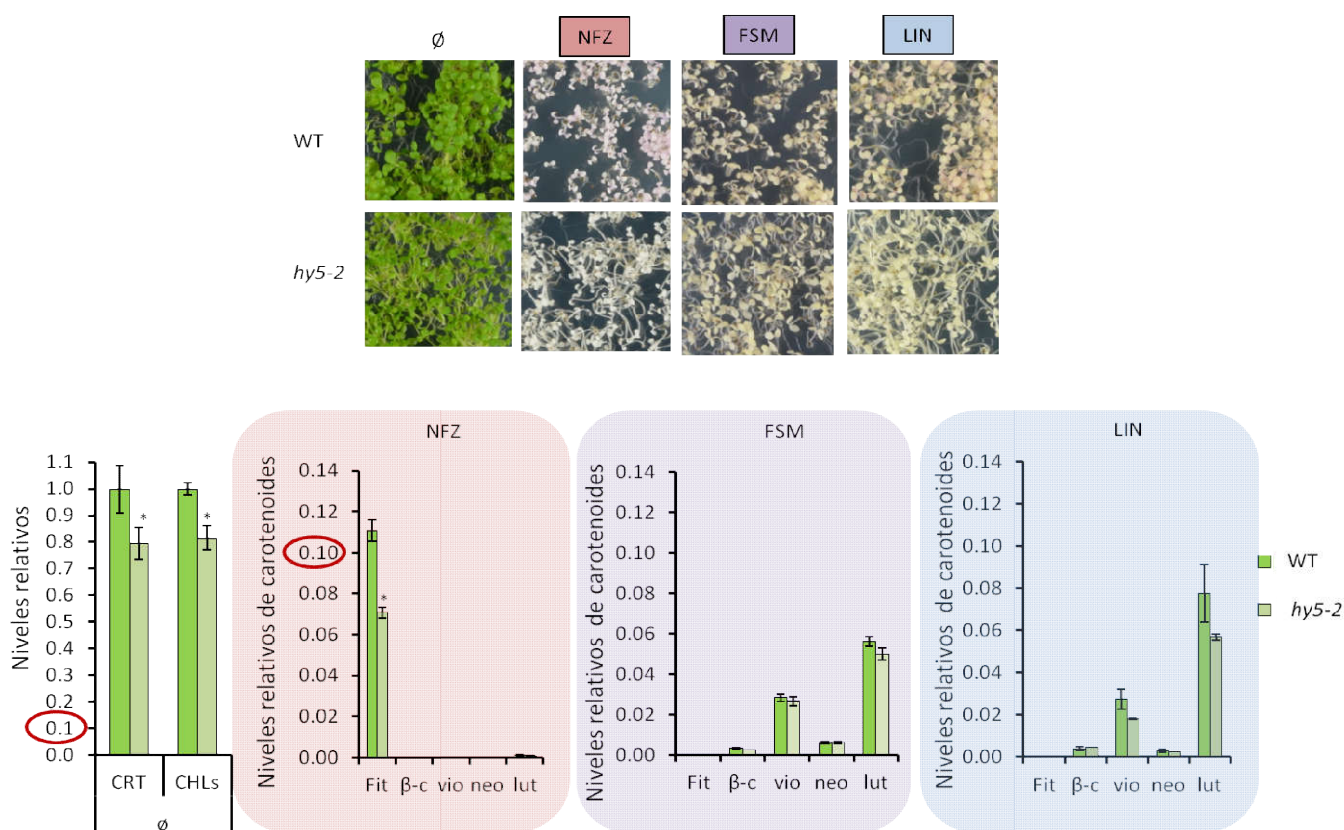


Figura R2.15 Perfil de carotenoides de plantas tratadas con inhibidores del cloroplasto.

Análisis por HPLC de los niveles de carotenoides de plantas WT y *hy5-2* sembradas en ausencia de inhibidores o en presencia de 5 μ M NFZ, 500 μ M FSM o 1 mM LIN y crecidas durante 7 días en luz W. La cantaxantina, un carotenoide no presente en plantas se usó como estándar interno. Se muestran los niveles de CHL y CRT de plantas WT y *hy5-2* sin tratamiento relativizados a los niveles del WT. En presencia de los diferentes inhibidores se muestra el % de carotenoides relativos a los niveles totales de carotenoides de muestras WT. Las abreviaturas corresponden a: fitoeno (fit), β -caroteno (β -c), violaxantina (vio), neoxantina (neo), luteína (lut). Las medias y el SE corresponden a de tres replicas biológicas independientes (n=3). Los asteriscos indican las diferencias significativas en la cantidad de carotenoides entre WT y *hy5-2* mediante la Prueba t de Student ($p < 0.05$).

Posteriormente, confirmamos genéticamente nuestros resultados cruzando *hy5-2* con mutantes deficientes en la vía del MEP (*dxs-1*, *hdr-1*) y en la síntesis de carotenoides (*psy-1*) (**Figura R2.1**). Dado que la pérdida de función de DXS, HDR o PSY genera un fenotipo albino letal (es decir, no pueden mantenerse en homocigosis), los cruces se realizaron entre plantas *hy5-2* homocigotas (-/-) y plantas heterocigotas (+/-) para el resto de las mutaciones. De las poblaciones F_2 resultantes se aislaron individuos verdes alargados, que posteriormente se pasaron a tierra para confirmar por PCR la presencia del T-DNA en el gen *HY5* en homocigosis y en el segundo gen correspondiente (*DXS*, *HDR*, o *PSY*) en heterocigosis. Las plantas genotipadas como *hy5-2*(-/-) *dxs-1*(+/-), *hy5-2*(-/-) *hdr-1*(+/-), y *hy5-2*(-/-) *psy-1*(+/-) segregaron individuos F_3 albinos (es decir, dobles homocigotos) en la proporción esperada en todos los casos. Semillas de las plantas F_2 se crecieron durante 2 días en W y después 5 días en W o W+FR tal y como

hicimos en los experimentos anteriores. Después medimos la elongación del hipocotilo únicamente en las dobles homocigotas (es decir, aquellas que presentaban fenotipo albino) y se comparó su respuesta a sombra con la de los correspondientes parentales y plantas WT crecidas a la vez (**Figura R2.16**). Mientras que los dobles mutantes *hy5-2 dxs-1* y *hy5-2 hdr-1* prácticamente no responden a sombra (tal y como sucede en el mutante *hy5-2* tratado con inhibidores de la ruta del MEP), el doble mutante *hy5-2 psy-1* se comporta igual que plantas *hy5-2* tratadas con NFZ, presentando una inducción de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra significativa ($p < 0.05$). Este resultado nos confirma genéticamente que para que plantas sin cloroplastos funcionales puedan responder a sombra se requiere la pérdida de función de HY5 y la ausencia de carotenoides.

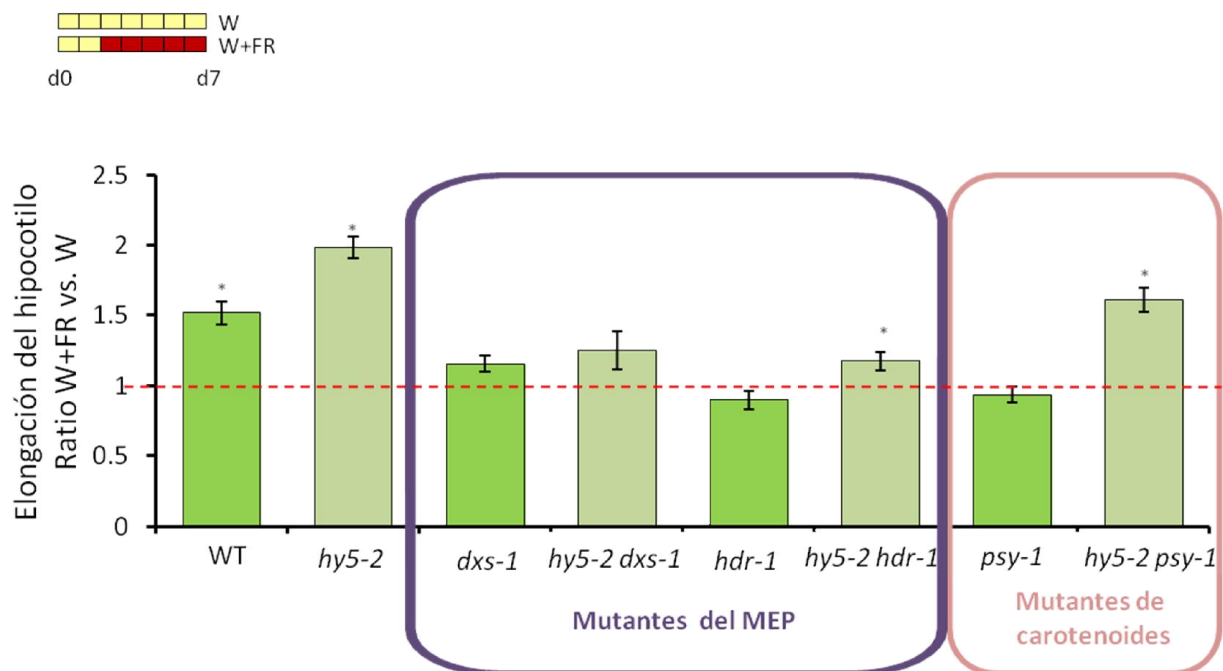


Figura R2.16 Confirmación genética de HY5 y de los de los carotenoides como correpresores de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra.

Elongación del hipocotilo en respuesta a sombra de los mutantes *hy5-2*, *dxs-1*, del doble mutante *hy5-2 dxs-1*, *hdr-1*, del doble mutante *hy5-2 hdr-1*, *psy-1* y del doble mutante *hy5-2 psy-1* crecidos junto a plantas WT durante 2 días en luz W y 5 días en luz W o W+FR. Se midió el hipocotilo de las plantas azigotas para *dxs-1*, *hdr-1* y *psy-1* que resultan ser albinas tanto en los mutantes simples como en los dobles mutantes. Las barras indican el ratio de respuesta a W+FR para cada mutante, así como el SE propagado correspondiente de un total de 20 plántulas ($n=20$) de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias significativas en la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra para cada mutante mediante la Prueba t de Student ($p < 0.05$).

El siguiente paso para confirmar la correlación entre niveles de carotenoides y bloqueo de la respuesta a sombra en el mutante *hy5-2* fue el estudiar esta respuesta en presencia de distintas concentraciones de NFZ (**Figura R2.17**). En las plantas WT el NFZ

no afecta la longitud del hipocotilo en W pero sí inhibe la respuesta a W+FR incluso a concentraciones de inhibidor que no alteran el color verde de las plantas y la autofluorescencia de la clorofila (**Figura R2.17**). Concentraciones de NFZ que producen plántulas albinas bloquean totalmente la respuesta a sombra en el WT. En contraste, la longitud de las plántulas mutantes *hy5-2* sí decrece en W a medida que aumenta la concentración de NFZ. Cantidades bajas del inhibidor producen una inhibición de la respuesta de alargamiento en sombra similar en plantas WT y mutantes, pero a concentraciones altas la respuesta se reprime mucho más lentamente en *hy5-2* (**Figura R2.17**). Este resultado sugiere que HY5 y los carotenoides (o sus derivados) podrían reprimir la respuesta a sombra de forma independiente.

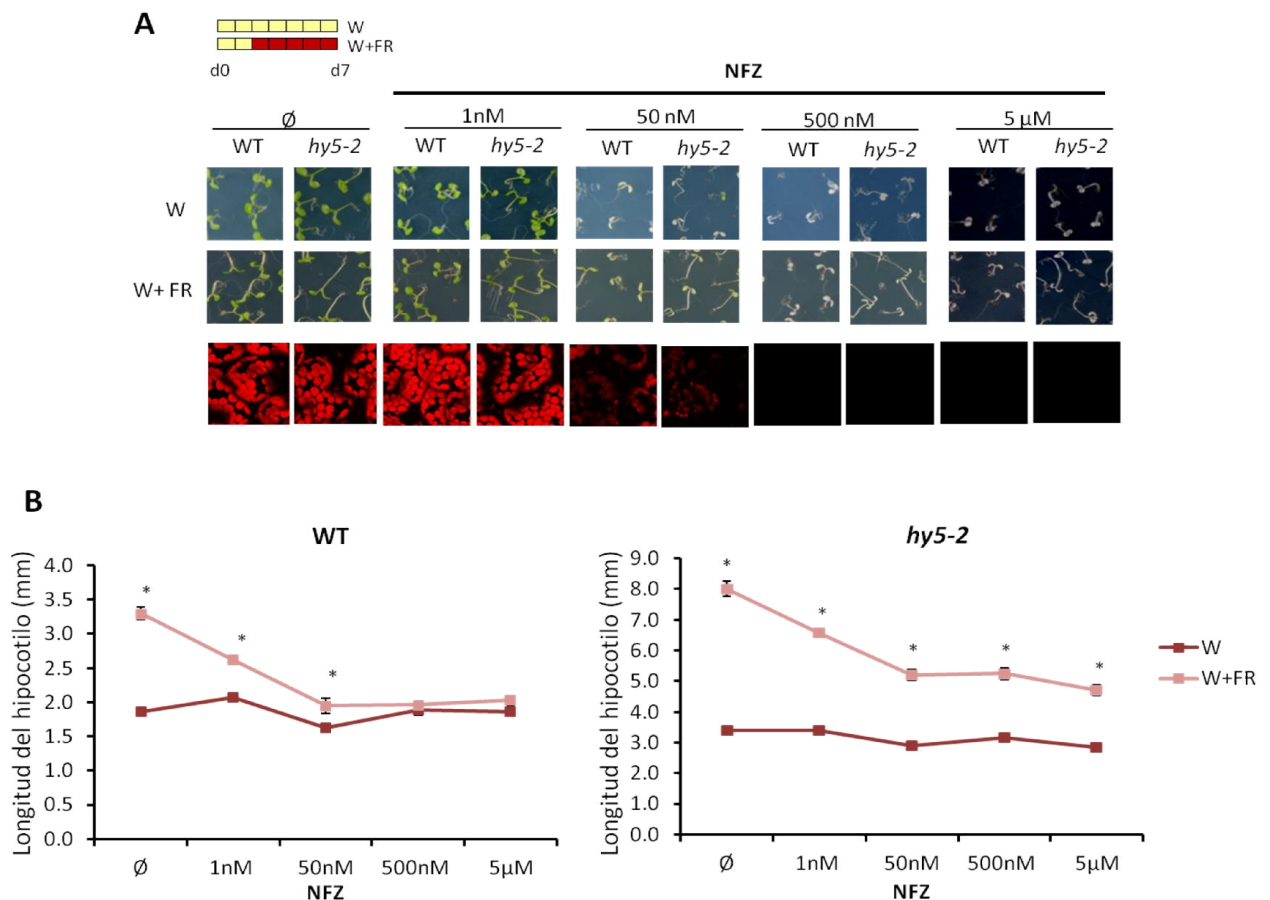


Figura R2.17 Correlación entre niveles de carotenoides y bloqueo de la respuesta a sombra en el mutante *hy5-2*.

Elongación del hipocotilo en respuesta a sombra del mutante *hy5-2* en comparación a plantas control WT sembradas en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de NFZ (1 nM, 50 nM, 500nM y 5μM). Las plantas se crecieron durante 2 días en luz W y 5 días en luz W o W+FR y posteriormente se midió el hipocotilo. Junto con las fotografías en el margen inferior se presentan imágenes de confocal que representan la autofluorescencia de los cloroplastos para cada concentración de inhibidor. Las gráficas representan la longitud del hipocotilo de plantas WT y *hy5-2* en luz W y luz W+FR respectivamente, y en presencia de las diferentes concentraciones de NFZ. Se representan los longitudes medias así como el SE correspondiente a un total de 25 plántulas para cada tratamiento (n=25) de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias significativas en la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra para cada mutante mediante la Prueba t de Student ($p < 0.05$).

2.3 Varias señales retrógradas derivadas de carotenoides reprimen la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra

Tal y como se mostró en la **Figura R2.14**, los inhibidores de la síntesis de carotenoides NFZ y CPTA son los únicos que permiten la respuesta a sombra de plantas deficientes en HY5 a pesar de no poseer cloroplastos funcionales. NFZ inhibe la desaturación del fitoeno en el segundo paso de la ruta de síntesis de carotenoides, mientras que el CPTA actúa más adelante en la vía, impidiendo la ciclación de los extremos de la molécula de licopeno para generar α -caroteno (a partir del cual se produce la luteína) y β -caroteno (que posteriormente se convierte en violaxantina y neoxantina). Esto, junto con el resto de resultados, nos hace pensar que la ausencia de un carotenoide que se encuentra más abajo del licopeno podría ser la causante del fenotipo de respuesta a sombra de *hy5-2*. Otra alternativa, aunque menos probable *a priori*, es que la causa de este fenotipo sea la acumulación de un precursor de los carotenoides por encima de fitoeno (**Figura R2.1**).

Varios metabolitos relacionados con los carotenoides han sido recientemente identificados como señales retrógradas (**Figura R2.1**). Entre los derivados de carotenoides por debajo del licopeno, los más estudiados han sido el β -ciclocitral, derivado de la rotura oxidativa no enzimática del β -caroteno (Ramel et al. 2012) y el ácido abscísico (ABA), sintetizado a partir de la violaxantina y la neoxantina (Xu & Leister et al. 2014). Por otro lado, el MEcPP es un intermediario de la vía del MEP (y por tanto precursor de los carotenoides) que actúa como una señal retrógrada en respuesta al estrés (Xiao et al. 2012). En este apartado de la tesis se ha estudiado el posible papel en la respuesta a sombra de estos metabolitos y otros relacionados.

2.3.1 MEcPP y ruta del MEP

Estudios recientes han demostrado que el MEcPP actúa como señal retrógrada para la inducción de genes relacionados con respuesta a estrés (Xiao et al. 2012; Benn et al. 2016; Lemos et al. 2016). El MEcPP se transforma en IPP y DMAPP por la acción consecutiva de dos enzimas, HDS y HDR (**Figura R2.1**). La pérdida parcial de función de la primera en el mutante *hds-3*, también denominado *csb3* (*CONSTITUTIVE SUBTILISIN 3*), hace que estas plantas acumulen 200 veces más MEcPP que las WT (González-Cabanelas et al. 2015). Si la respuesta de *hy5-2* a sombra requiere la acumulación de MEcPP (por el tratamiento con NFZ o CPTA), entonces esperaríamos que el doble mutante *hy5-2 hds-3* fuese capaz de responder a sombra al bloquear el desarrollo de los cloroplastos con un inhibidor independiente de carotenoides y de la ruta del MEP. Para ello realizamos el doble mutante *hy5-2 hds-3* y lo crecimos junto con los mutantes simples *hds-3*, *hy5-2* y WT en presencia de NFZ y LIN durante 5 días en W o W+FR. Posteriormente, medimos la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra.

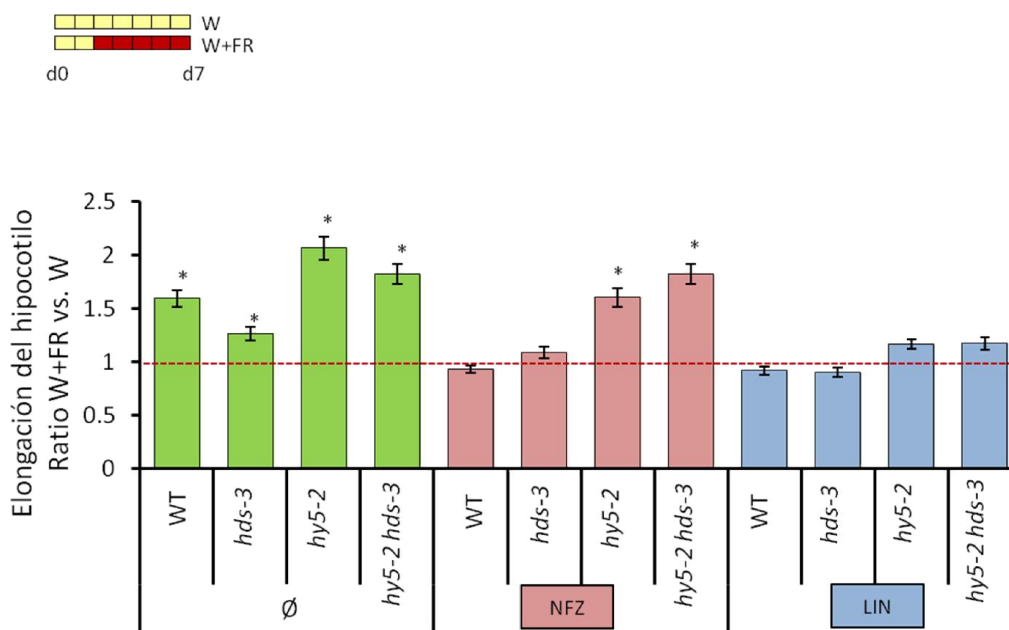


Figura R2.18 Efecto del MEcPP en la represión de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra.

Elongación del hipocotilo en respuesta a sombra de plantas WT y los mutantes *hy5-2*, *hds-3* y del doble mutante *hy5-2 hds-3* sembrados en ausencia o presencia de 5 μ M NFZ o 1mM LIN. Se crecieron durante 2 días en luz W y 5 días en luz W o W+FR. Las barras indican el ratio de respuesta a W+FR para cada mutante, así como el SE propagado correspondiente de un total de 25 plántulas (n=25) de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias significativas en la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra para cada mutante mediante la Prueba t de Student ($p < 0.05$).

Según nuestros resultados, en ausencia de inhibidor *hds-3* responde menos a sombra que el WT, aunque su respuesta es aún significativa ($p < 0.05$). De la misma forma, *hy5-2 hds-3* responde ligeramente menos a sombra que *hy5-2*, lo que sugiere que la acumulación de MEcPP en plantas verdes podría tener un efecto represor de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra. Sin embargo, en plantas tratadas con NFZ la mutación *hds-3* parece tener un efecto contrario, activando ligeramente esta respuesta (**Figura R2.18**). En presencia de LIN, el doble mutante *hy5-2 hds-3* no recupera la respuesta a sombra con respecto al mutante simple *hy5-2* (**Figura R2.18**), lo que sugiere que la acumulación de MEcPP no es la causante de que plantas deficientes en HY5 y crecidas en NFZ alarguen sus hipocotilos en respuesta a sombra. De forma consistente con esta conclusión, el bloqueo de la producción de MEcPP en plantas WT tratadas con inhibidores de la vía MEP (CLM y FSM) junto con NFZ (**Figura R2.14B**) no impidió la respuesta de alargamiento a la sombra de las plántulas *hy5-2*. En conjunto, los datos apoyan nuestra conclusión de que no es la acumulación de un metabolito anterior al fitoeno sino la desaparición de un metabolito posterior al licopeno en la vía de carotenoides lo que permite a las plantas *hy2-5* responder a la sombra.

2.3.2 Luteína o derivados

Para determinar si la ausencia de luteína es decisiva para la inducción de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra por parte de *hy5-2*, realizamos el cruce de este mutante con *lut2-3* (SALK_005018), un mutante deficiente en luteína (**Figura R2.1**) (Pogson et al. 1996; Pérez-Gil 2013). Mediante HPLC pudimos confirmar que ni las plantas *lut2-3* ni el doble mutante *hy5-2 lut2-3* acumulaban luteína (**Figura R2.19A**). Posteriormente, se crecieron plantas WT, el doble mutante, y sus parentales en presencia o ausencia de NFZ y LIN, se expusieron a sombra durante 5 días, y finalmente se midió la longitud del hipocotilo de plantas de los 4 genotipos ensayados (**Figura R2.19B**). En ausencia de inhibidores no vimos ninguna diferencia entre la respuesta a sombra de plantas WT y *lut2-3* o los mutantes *hy5-2 lut2-3* y *hy5-2*; tampoco existían diferencias significativas en el caso de NFZ, tal y como se esperaba, ni en el caso de LIN (en el que se hubiera esperado una respuesta del doble mutante si la luteína estuviese reprimiendo la respuesta de alargamiento). Estos resultados muestran que la ausencia de luteína o de un derivado de este carotenoide no permite al mutante *hy5-2* responder a sombra, lo que sugiere que es otro el carotenoide (o derivado) involucrado.

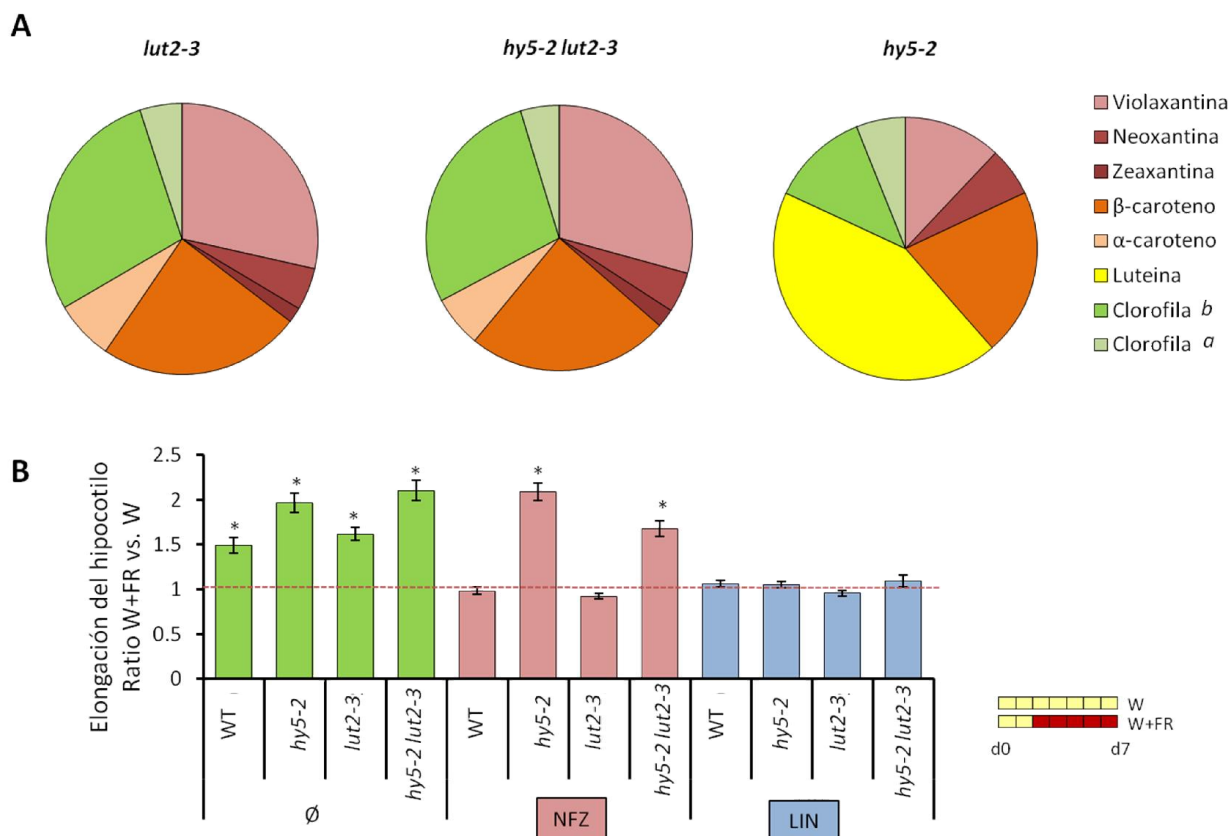


Figura R2.19 Efecto de la luteína en la represión de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra.

A) Análisis por HPLC de los niveles de pigmentos de plantas *lut2-3*, *hy5-2* y dobles mutantes *hy5-2 lut2-3* expuestas durante 7 días en luz W. La cantaxantina, un carotenoide no presente en plantas se usó como estándar interno. En el gráfico se muestra la proporción de los diferentes pigmentos respecto al total con tal de determinar la ausencia total de luteína en *lut2-3* y *hy5-2 lut2-3*. B) Elongación del hipocotilo en respuesta a sombra de los mutantes *hy5-2*, *lut2-3* y del doble mutante *hy5-2 lut2-3* sembrados en ausencia o presencia de 5 μ M NFZ o 1mM LIN. Se crecieron durante 2 días en luz W y 5 días en luz W o W+FR. Las barras indican el ratio de respuesta a W+FR para cada mutante, así como el SE propagado correspondiente de un total de 25 plántulas (n=25) de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias significativas en la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra para cada mutante mediante la Prueba t de Student ($p < 0.05$).

2.2.3 β -ciclocitral

Otro carotenoide candidato sería el producto de la oxidación del β -caroteno, el β -ciclocitral, que está descrito como señal retrógrada (Ramel et al. 2012) (**Figura R2.1**). Debido a que su formación es no enzimática, no disponemos de mutantes específicos de su síntesis. Por tanto decidimos hacer pruebas añadiéndolo a la placa de crecimiento. Si la ausencia de β -ciclocitral en plantas *hy5-2* tratadas con NFZ (o CPTA) es lo que hace que estas respondan a sombra alargándose, esperaríamos que en medio suplementado con NFZ y β -ciclocitral se anulase esta respuesta. Aunque el planteamiento es simple, el β -ciclocitral es un producto volátil y tuvimos que poner a punto la forma de administrarlo. En primer lugar, se sembraron plantas WT y se

administraron diferentes cantidades de β -ciclocitral en un papel absorbente depositado en el centro de la placa, sellándose posteriormente con parafilm (**Figura R2.20A**). Después de germinarlas en las placas y crecerlas durante 7 días en W, observamos que con cantidades muy pequeñas de β -ciclocitral (0.32 nM) ya se genera un halo de inhibición de la germinación, recordando el efecto que también produce el ABA a concentraciones elevadas. Para evitar esta heterogeneidad y los efectos no deseados sobre la germinación, se añadieron concentraciones más bajas del compuesto directamente al medio. Después, se sembraron plantas WT y se selló la placa con parafilm. Así las crecimos en presencia o ausencia de sombra y se midió la longitud del hipocotilo, con tal de determinar si el β -ciclocitral tenía algún efecto (**Figura R2.20B**). En presencia de concentraciones muy bajas de β -ciclocitral (0.04 nM) la respuesta a sombra pasa a ser incluso negativa (es decir, las plantas expuestas a W+FR se alargan menos que las expuestas a W), indicando que el β -ciclocitral tiene un fuerte poder represor de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra. La importancia de este compuesto volátil en la respuesta a sombra podría explicar también la observación de que las plantas WT crecidas en placas selladas con parafilm (es decir, en las que se impide el intercambio gaseoso) tienen una respuesta ligeramente negativa a sombra incluso en medio no suplementado con β -ciclocitral (**Figura R2.20C**).

Posteriormente investigamos si la adición de β -ciclocitral era capaz de anular la respuesta a sombra de *hy5-2* en presencia de NFZ. Para ello, sembramos plantas mutantes en ausencia o presencia de β -ciclocitral (0.02 nM) y NFZ, sellamos todas las placas con parafilm, y las crecimos exponiéndolas a W o W+FR durante 5 días (**Figura R2.20C**). Aun con las placas selladas, el mutante *hy5-2* es capaz de responder significativamente ($p < 0.05$) en presencia de NFZ (**Figura R2.20C**). En cambio, en presencia de β -ciclocitral y NFZ la respuesta de *hy5-2* se encuentra totalmente bloqueada. Por lo tanto, estos resultados sugieren la posibilidad de que el β -ciclocitral sea el carotenoide cuya ausencia hace que podamos ver la represión ejercida por HY5 en presencia de cloroplastos disfuncionales.

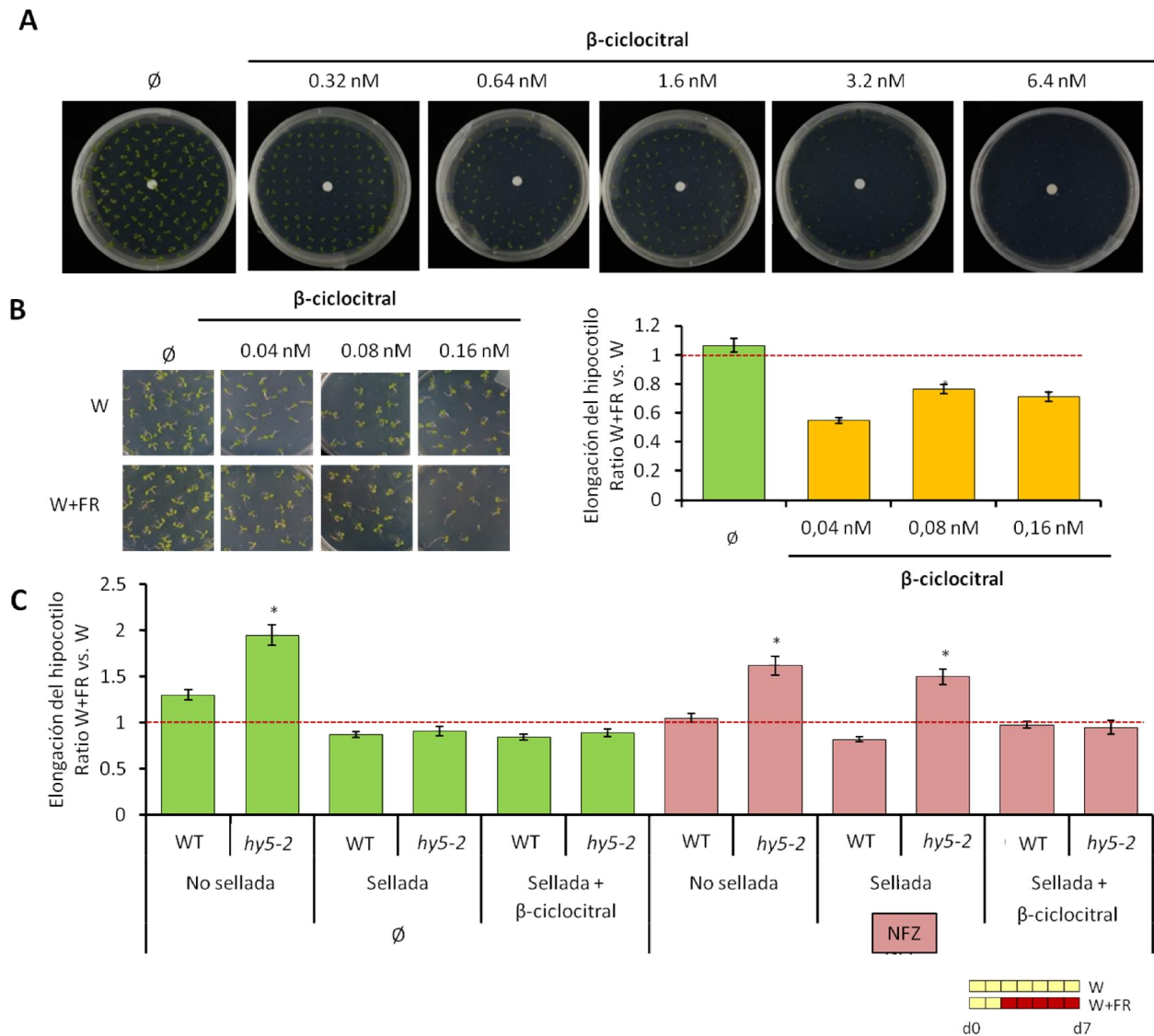


Figura R2.20 Efecto del β -ciclocitral en la represión de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra.

A) Fotografías de placas que muestran el efecto represor en la germinación por parte del β -ciclocitral. Para ello se sembraron semillas WT en placas con un papel impregnado con las concentraciones indicadas de β -ciclocitral, se sellaron con parafilm y posteriormente se incubaron en W durante 7 días.

B) Elongación del hipocotilo en respuesta a sombra de plantas WT en presencia de las concentraciones de β -ciclocitral indicadas. Las plantas se crecieron durante 2 días en luz W y 5 días en luz W o W+FR y posteriormente se midió el hipocotilo.

C) Elongación del hipocotilo en respuesta a sombra de plantas WT y *hy5-2* en presencia o ausencia de 0.02 nM de β -ciclocitral y en presencia o ausencia de 5 μ M NFZ. Para el tratamiento con β -ciclocitral y con tal de comparar diferentes tratamientos se sellaron las placas tal y como se indica en la gráfica. Las plantas se crecieron durante 2 días en luz W y 5 días en luz W o W+FR y posteriormente se midió el hipocotilo. Las barras en B y C indican el ratio de respuesta a W+FR para cada genotipo y condición, así como el SE propagado correspondiente de un total de 25 plántulas ($n=25$) de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias significativas en la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra para cada mutante mediante la Prueba t de Student ($p<0.05$).

2.3.4 Ácido absícico (ABA)

El ABA es una hormona implicada en múltiples respuestas como en la dormancia y la germinación de las semillas, así como en estrés hídrico y salino, además de ser identificada como señal retrógrada (Baier & Dietz 2005). Se sintetiza a partir de la violaxantina y la neoxantina vía xantonina (**Figura R2.1**). Siguiendo el razonamiento anteriormente descrito para el β -ciclocitral, realizamos un experimento inicial suplementando el medio de crecimiento con ABA exógeno (**Figura R2.21**). Tal y como se puede observar, a concentraciones crecientes de ABA vemos una inhibición progresiva de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra tanto en plantas verdes WT como en plantas *hy5-2* verdes (no tratadas con NFZ) y albinas (tratadas con NFZ). Por lo tanto, podemos concluir que el ABA reprime la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra, y que además esta represión es independiente de la presencia o ausencia de HY5 ya que se produce tanto en WT como en *hy5-2*.

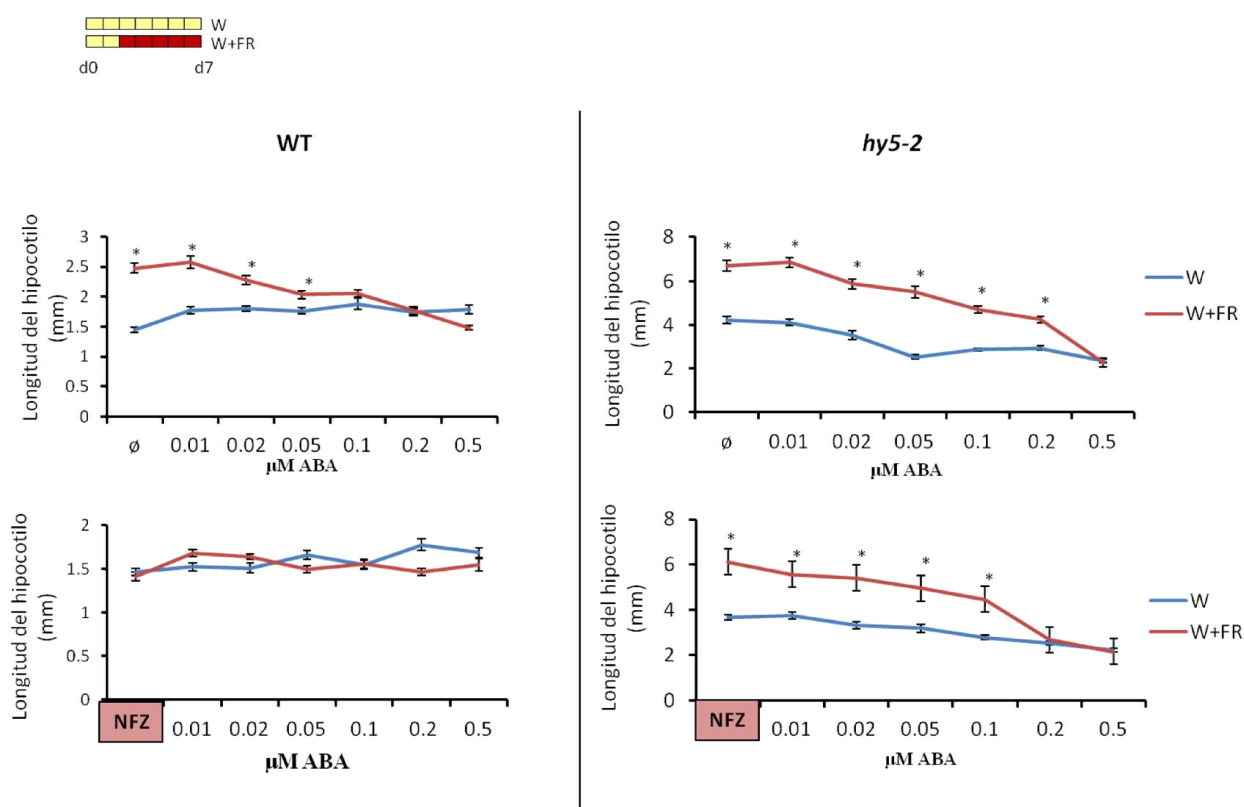


Figura R2.21 Efecto de la adición de ABA en la represión de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra.

Elongación del hipocotilo en respuesta a sombra del mutante *hy5-2* en comparación a plantas control WT en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de ABA introducidas en el medio indicadas en la figura y en presencia o ausencia de 5 μ M NFZ. Las plantas se crecieron durante 2 días en luz W y 5 días en luz W o W+FR y posteriormente se midió el hipocotilo. Se representan los longitudes medias así como el SE correspondiente a un total de 25 plántulas para cada tratamiento ($n=25$). Los asteriscos indican las diferencias significativas en la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra para cada mutante mediante la Prueba t de Student ($p<0.05$).

Para confirmar estos resultados a nivel genético, utilizamos el mutante *aba2 (gin1-3)*, deficiente en el enzima que transforma la xantonina en ABA-aldehído durante la síntesis de ABA (Schwartz et al. 1991) (**Figura R2.1**). Este mutante posee una deficiencia en ABA pero no de carotenoides y clorofilas. De hecho, el análisis de plantas WT y mutantes *aba2* por HPLC (**Figura R2.22A**) mostró niveles ligeramente mayores de clorofilas y carotenoides en el mutante, aunque no significativamente diferentes. El cruce de *aba2* con *hy5-2* permitió obtener el doble mutante *hy5-2 aba2* para analizar la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra en presencia de NFZ y LIN (**Figura R2.22B**). Si es el ABA el derivado de carotenoides que precisa estar ausente para observar la respuesta del mutante *hy5-2* esperábamos que en presencia de LIN el doble mutante fuera capaz de mostrar una respuesta a sombra. Según nuestros resultados, la mutación *aba2* (es decir, la deficiencia de ABA) aumenta la respuesta de plantas con cloroplastos activos a sombra. Esto ocurre tanto en plantas *aba2* como *hy5-2 aba2*, lo que confirma un papel de ABA como represor de esta respuesta. Por otra parte, el doble mutante responde más a sombra que *hy5-2*, y el mutante *aba2* responde ligeramente más que el WT, confirmando que la represión de la respuesta a sombra por ABA es aditiva a la represión causada por HY5. Por tanto, estos resultados apoyan nuestra conclusión anterior que HY5 y un derivado de carotenoide (en este caso, ABA) reprimen la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra por vías independientes. En plantas con cloroplastos inactivos (es decir, tratadas con inhibidores), la mutación *aba2* permitió la respuesta del doble mutante a sombra en todos los casos, restableciéndola en el caso de LIN. Este resultado, nos indica que la ausencia de ABA (que no puede producirse cuando se trata con NFZ o CPTA pero sí con el resto de inhibidores) permite observar la represión de la respuesta a sombra por parte de HY5.

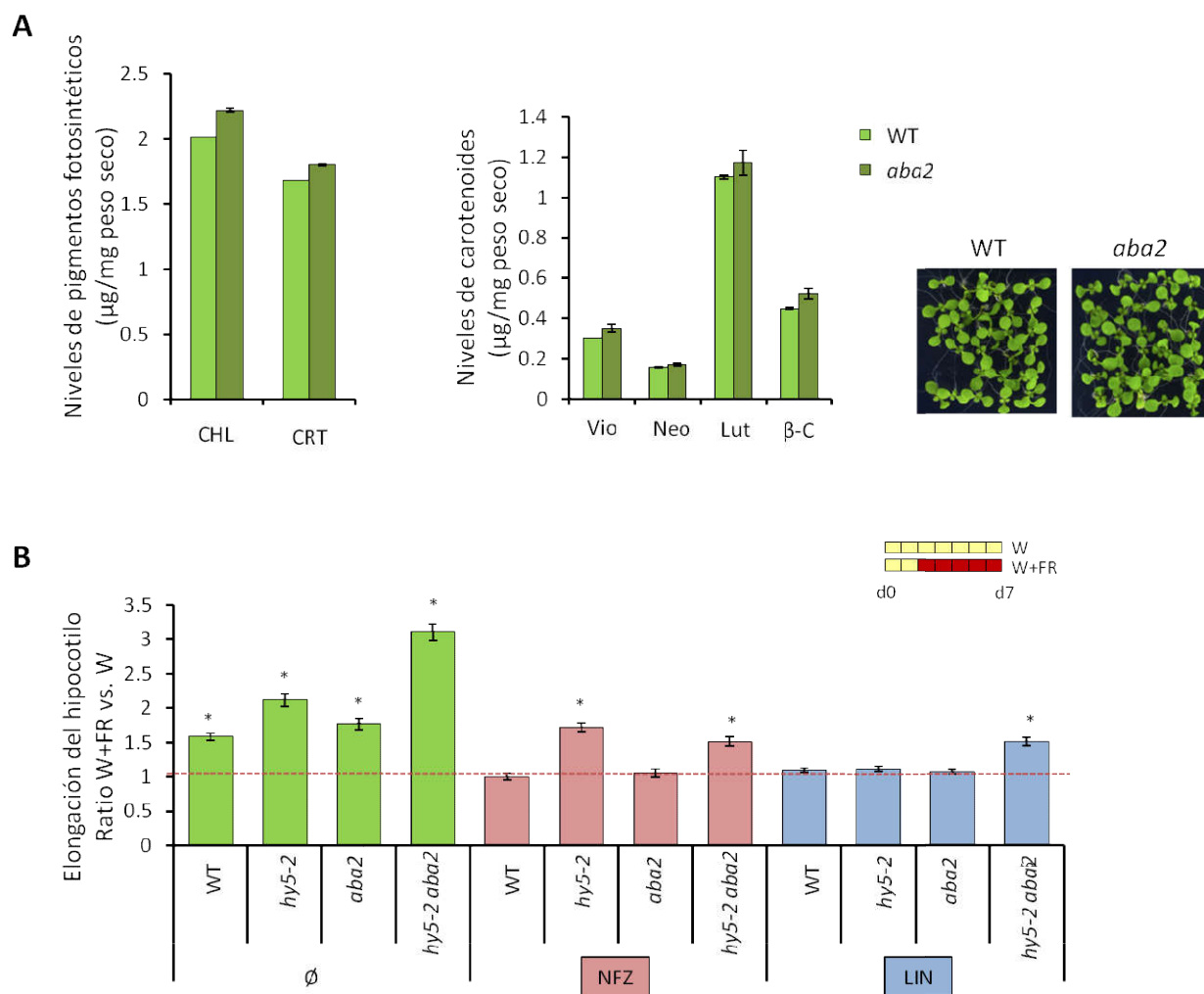


Figura R2.22 Confirmación genética del efecto del ABA en la represión de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra.

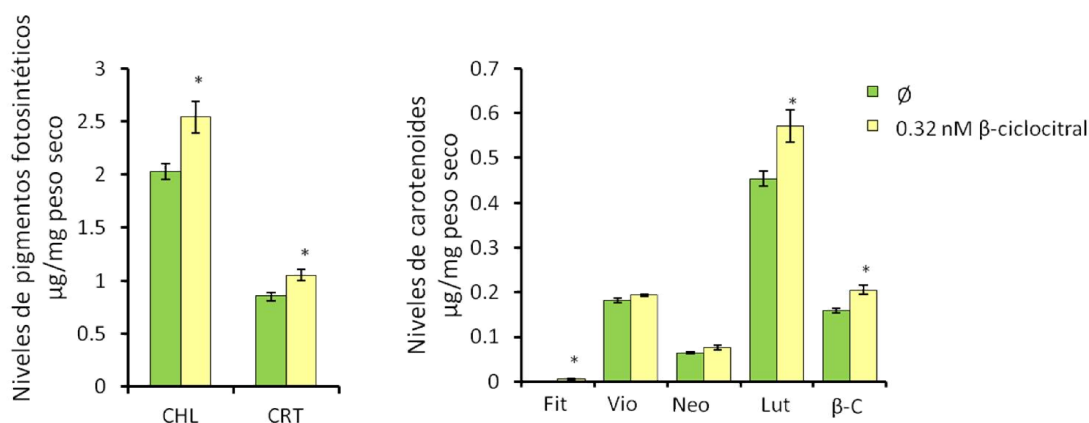
A) Análisis por HPLC de los niveles de carotenoides de plantas WT y *aba2* expuestas durante 7 días en luz W en ausencia de inhibidores. La cantaxantina, un carotenoide no presente en plantas se usó como estándar interno. Se muestran los niveles de CHL y CRT como μg/mg peso seco, así como los niveles de los diferentes carotenoides. Las abreviaturas corresponden a las indicadas en la Figura R2.15. Las medias y el SE corresponden a de tres replicas biológicas independientes (n=3). B) Elongación del hipocotilo en respuesta a sombra de los mutantes *hy5-2*, *aba2* y del doble mutante *hy5-2 aba2* sembrados junto a plantas WT en medio sin suplementar o suplementado con 5 μM NFZ, 500 μM FSM o 1mM LIN. Se crecieron durante 2 días en luz W y 5 días en luz W o W+FR. Las barras indican el ratio de respuesta a W+FR para cada mutante, así como el SE propagado correspondiente de un total de 25 plántulas (n=25) de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias significativas en la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra para cada mutante mediante la Prueba t de Student (p<0.05).

2.3.5 Interacción entre β-ciclocitral y ABA

Mientras que los abordajes genéticos sugieren un papel para el ABA como represor del alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra, los experimentos farmacológicos sugieren que tanto el ABA como el β-ciclocitral podrían ejercer ese papel. En este apartado nos planteamos responder a la pregunta de si el ABA y el β-ciclocitral actúan

de forma independiente en la represión de la respuesta a sombra. Curiosamente, el tratamiento con β -ciclocitral hace que las plantas adquirieran una tonalidad verde más oscura. Para estudiar si esto es debido a una mayor acumulación de pigmentos fotosintéticos, analizamos el contenido de carotenoides y clorofilas por HPLC de plantas WT tratadas con β -ciclocitral (0.32 nM) y los comparamos con las plantas sin tratar (**Figura R2.23A**). Los resultados muestran que el tratamiento con β -ciclocitral aumenta los niveles de clorofilas y también de carotenoides, incluidos los precursores del ABA. Es por tanto posible que el estrés causado por el bloqueo del desarrollo de los cloroplastos con inhibidores provoque la oxidación de β -caroteno a β -ciclocitral, que a su vez aumentaría la biosíntesis de carotenoides y como consecuencia podría hacer incrementar indirectamente los niveles de ABA (**Figura R2.1**). Por tanto, es posible que la acción de estos dos metabolitos derivados de carotenoides esté interrelacionada.

A



B

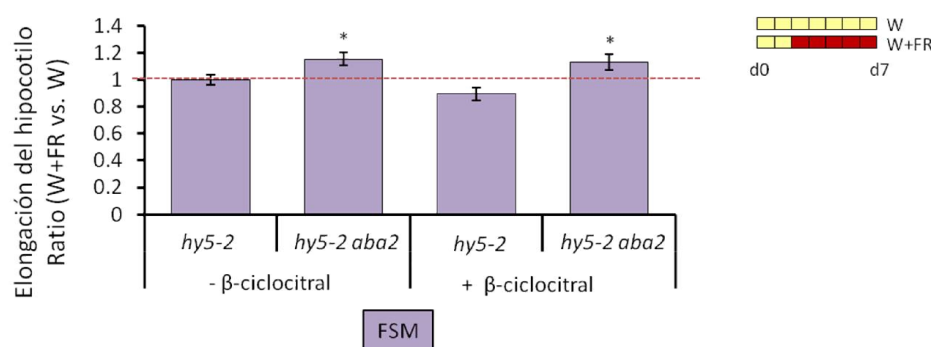


Figura R2.23 Relación entre el β -ciclocitral y el ABA en el control de la respuesta a sombra.

A) Análisis por HPLC de los niveles de carotenoides de plantas WT y tratadas con 0.32nM de β -ciclocitral expuestas durante 7 días en luz W en ausencia de inhibidores. La cantaxantina, un carotenoide no presente en plantas se usó como estándar interno. Se muestran los niveles de los diferentes carotenoides: fitoeno, violaxantina, neoxantina, luteína y β -caroteno. Las medias y el SE corresponden a de tres replicas biológicas independientes (n=3). B) Elongación del hipocotilo en respuesta a sombra de los mutantes *hy5-2*, *aba2* y del doble mutante *hy5-2 aba2* sembrados en presencia de 500 μM FSM y en presencia o ausencia de 0.02 nM β -ciclocitral. Se crecieron durante 2 días en luz W y 5 días en luz W o W+FR. Las barras indican el ratio de respuesta a W+FR para cada mutante, así como el SE propagado correspondiente de un total de 25 plántulas (n=25) de un experimento representativo. Los asteriscos

indican las diferencias significativas en la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra para cada mutante mediante la Prueba t de Student ($p < 0.05$).

En plantas tratadas con NFZ, no se puede producir ni β -ciclocitral ni ABA. Por tanto, el efecto represor del β -ciclocitral sobre el alargamiento del hipocotilo de plantas *hy5-2* expuestas a sombra (**Figura R2.20C**) implica que el β -ciclocitral no necesita ABA para su efecto represor. El siguiente paso fue usar herramientas genéticas (el mutante *aba2*) para confirmar si el efecto represor del β -ciclocitral requiere síntesis de ABA. Para ello, medimos la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra del doble mutante *hy5-2 aba2* en presencia o ausencia de β -ciclocitral y lo comparamos con la respuesta de *hy5-2* (**Figura R2.23B**). Para bloquear el desarrollo de los cloroplastos utilizamos FSM en lugar de NFZ, ya que la FSM no bloquea completamente la síntesis de carotenoides precursores del ABA (**Figura R2.15**) y por tanto permite estudiar el posible efecto dependiente de ABA del β -ciclocitral. Si el β -ciclocitral reprime el alargamiento del hipocotilo de *hy5-2* porque induce la síntesis de ABA, esperaríamos que el doble mutante *hy5-2 aba2* no se pudiese alargar en respuesta a sombra en medio suplementado con FSM y β -ciclocitral. Sin embargo, observamos que el doble mutante se alargaba de forma similar con y sin β -ciclocitral (**Figura R2.23B**). La adición extra de β -ciclocitral al medio con FSM tiene un efecto mucho menor al observado en el medio con NFZ, seguramente porque en medio con FSM ya se produce β -ciclocitral endógenamente. En conjunto, nuestros resultados sugieren que el ABA y el β -ciclocitral forman parte de dos vías independientes de represión.

2.3.6 Otras señales retrógradas

Los resultados generados hasta este punto indican que derivados de carotenoides previsiblemente formados por los cloroplastos estresados (β -ciclocitral y ABA) reprimen la respuesta de alargamiento asociada al SAS por una vía independiente de HY5. Por otro lado, el bloqueo de la actividad de los cloroplastos con NFZ o LIN genera una señal retrógrada que inhibe la desactivación de los fitocromos en respuesta a sombra (**Figura R2.11**), lo que acaba impidiendo el alargamiento del hipocotilo de plantas expuestas a W+FR por una ruta que implica a HY5 como represor. En este punto nos planteamos identificar factores implicados en señalización retrógrada que estuviesen implicados en la ruta de HY5.

Los mutantes *gun* tienen impedida la señalización cloroplasto-núcleo de forma que no presentan casi cambios en la expresión en genes nucleares implicados en fotosíntesis (PhANGs) aunque estén tratadas con inhibidores como NFZ. Este es el caso de *gun1-101* (Ruckle et al. 2007) y *gun5-1* (Mochizuki et al. 2001). GUN1 codifica para una proteína integradora de varias rutas de señalización retrógrada (tetrapirroles, PGE, redox, etc), mientras que GUN5 codifica para una proteína necesaria para la inducción

de la señal retrógrada de tetrapirroles (Mg-ProtoIX). La vía de señalización dependiente de GUN1 y la de HY5 convergen para reprimir la transcripción de PhANGs en cloroplastos disfuncionales vía el factor de transcripción ABI4 (Larkin & Ruckle 2008; Ruckle et al. 2007). Por otro lado, la vía de señalización dependiente de GUN5 induce cambios directos en la actividad de HY5, transformándolo en un represor transcripcional de PhANGs (Kindgren et al. 2012b). Además HY5 también tiene como diana directa el promotor del gen *GUN5* induciéndolo (Toledo-Ortiz et al. 2014). Si la represión de la respuesta a sombra dependiente del bloqueo de los cloroplastos y mediada por HY5 requiere la señalización por GUN1 y/o GUN5, se esperaría que mutantes deficientes en esta señalización pudieran elongarse en respuesta a W+FR en medio suplementado con NFZ o LIN. Si esta respuesta fuese independiente de HY5, los dobles mutantes *hy5-51 gun1-101* y *hy5-2 gun5-1* tendrían una respuesta aditiva.

Para comprobar si la señal es dependiente de *GUN1*, sembramos plantas WT, *hy5-51*, *gun1-101*, y *hy5-51 gun1-101* (Alonso 2003; Ruckle et al. 2007) en presencia o ausencia de NFZ o LIN, y las expusimos a W o W+FR durante 5 días (**Figura R2.24A**). Como ya observamos anteriormente (**Figura R2.12**), el mutante *gun1-101* no presenta disminución en la respuesta a sombra en plantas con cloroplastos funcionales (**Figura R2.24A**), mientras que el mutante *gun5-1* tiene una menor respuesta a sombra que el WT (**Figura R2.24B**). Pero ninguno de los dos mutantes simples recupera la respuesta a sombra en presencia de NFZ o LIN, lo que sugiere que ni GUN1 ni GUN5 son necesarios para reprimir la respuesta a sombra al bloquear el desarrollo de los cloroplastos. En el caso de *hy5-51 gun1-101*, presenta una tendencia a una menor respuesta a sombra comparado con el mutante *hy5-2* tanto en medio sin inhibidor como en presencia de NFZ, mientras que en presencia de LIN presenta una ausencia total de respuesta. En el caso de *hy5-2 gun5-1* los resultados muestran la misma tendencia (**Figura R2.24B**).

En conjunto, los resultados sugieren que señales retrógradas dependientes de GUN1 y GUN5 serían relevantes para la respuesta a sombra cuando no está presente HY5, quizás participando en la ruta de represión independiente de HY5 y mediada por derivados de carotenoides como el ABA o el β -ciclocitral.

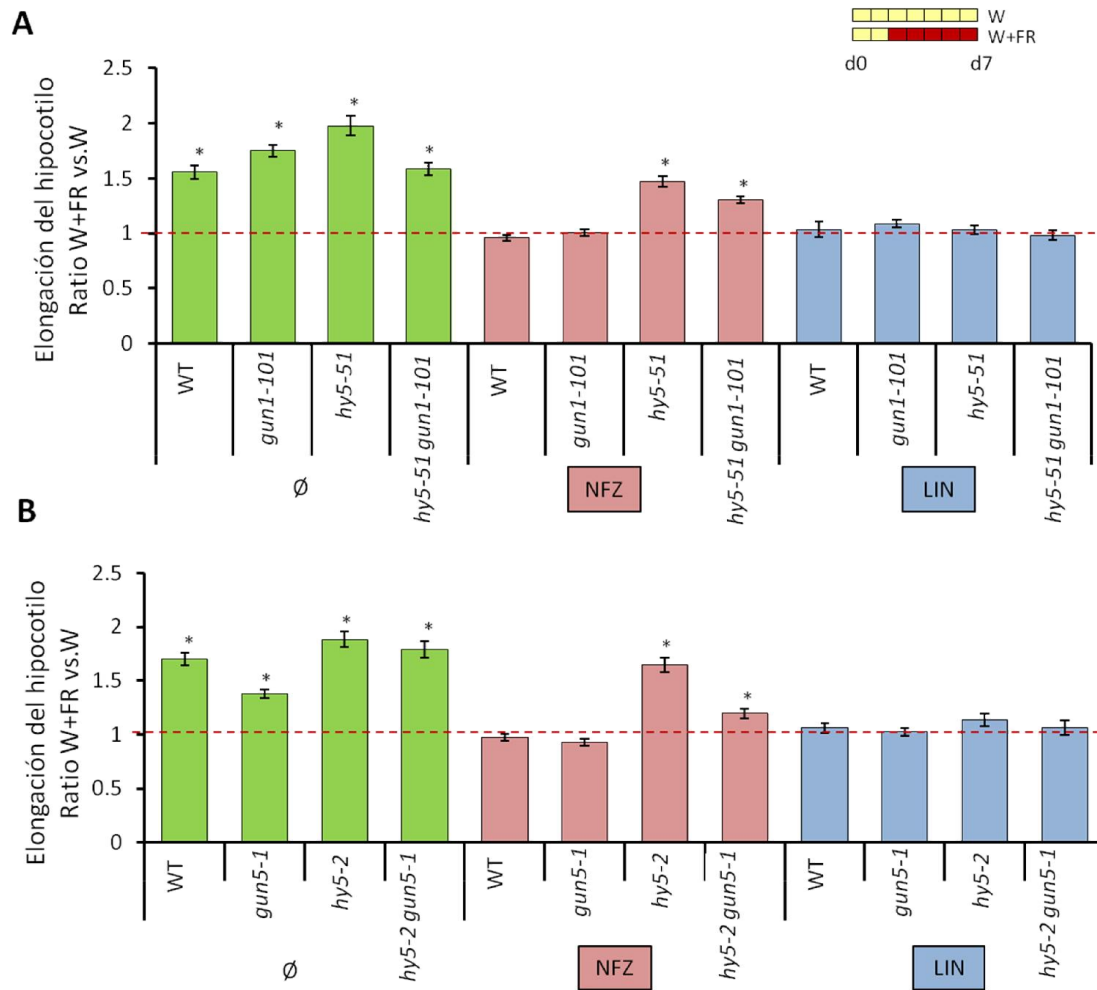


Figura R2.24 Efecto de la señal GUN1 y GUN5 en el control de la respuesta a sombra en presencia de cloroplastos disfuncionales.

A) Elongación del hipocotilo en respuesta a sombra de los mutantes *hy5-2*, *gun1-101* y del doble mutante *hy5-2 gun1-101* sembrados en presencia o ausencia de 5 μ M NFZ o 1mM LIN. Se crecieron junto con plantas WT durante 2 días en luz W y 5 días en luz W o W+FR. B) Elongación del hipocotilo en respuesta a sombra de los mutantes *hy5-2*, *gun5-1* y del doble mutante *hy5-2 gun5-1* crecidos junto con plantas WT en las mismas condiciones que A. En A y B las barras indican el ratio de respuesta a W+FR para cada mutante, así como el SE propagado correspondiente de un total de 25 plántulas (n=25) de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias significativas en la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra para cada mutante mediante la Prueba t de Student ($p < 0.05$).

2.4 Mecanismo de acción de HY5 y ABA como represores independientes de la respuesta a sombra

2.4.1 Las señales retrógradas aumentan los niveles de HY5

Según nuestros resultados, en nuestras condiciones experimentales HY5 actúa como represor de la elongación del hipocotilo cuya actividad represora disminuye en respuesta a sombra pero aumenta al bloquear la función de los cloroplastos. Para investigar si su efecto represor está regulado a nivel transcripcional, medimos los niveles de transcrito de *HY5* por PCR cuantitativa en plantas WT y *hy5-2* crecidas durante 7 días en W y a continuación expuestas a W+FR durante 1h, 4h y 8h (**Figura R2.25A**). Nuestros resultados muestran que los niveles de transcrito de *HY5* en el WT varían muy poco en nuestras condiciones de sombra, mientras que como era de esperar *hy5-2* mantiene unos niveles de transcritos muy bajos. En presencia de NFZ hay una inducción significativa ($p < 0.05$) de los niveles de transcrito de *HY5* respecto a las plantas crecidas sin inhibidor (**Figura R2.25B**), lo que es consistente con la observación que en medio con NFZ se reprime la respuesta de elongación. Sin embargo, no se observan diferencias en los niveles de transcritos de *HY5* durante el tratamiento de sombra (**Figura R2.25B**).

También determinamos los niveles de transcrito de *HY5* en plantas WT con tratamientos largos de sombra en presencia y ausencia de NFZ. Para ello, crecimos plantas WT en presencia de concentraciones crecientes de NFZ durante 2 días en W y después 5 días en W o en W+FR (**Figura R2.25C**). A medida que incrementamos la concentración de inhibidor van aumentando los niveles de transcrito de *HY5* independientemente del tratamiento de luz (**Figura R2.25C**), lo que sugiere que la expresión del gen responde al bloqueo de los cloroplastos. Con este diseño experimental tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de transcrito entre plantas expuestas a W o a W+FR (**Figura R2.25C**). Por último comparamos qué sucedía con los niveles de transcrito de *HY5* en plantas WT crecidas en presencia de otros inhibidores de la función cloroplastídica (**Figura R2.25D**). Observamos que, al igual que ocurría con NFZ, los niveles de transcritos de *HY5* se incrementan significativamente ($p < 0.05$) en las muestras crecidas en presencia de FSM o LIN, sin que existan diferencias en presencia o ausencia de sombra simulada (**Figura R2.25D**).

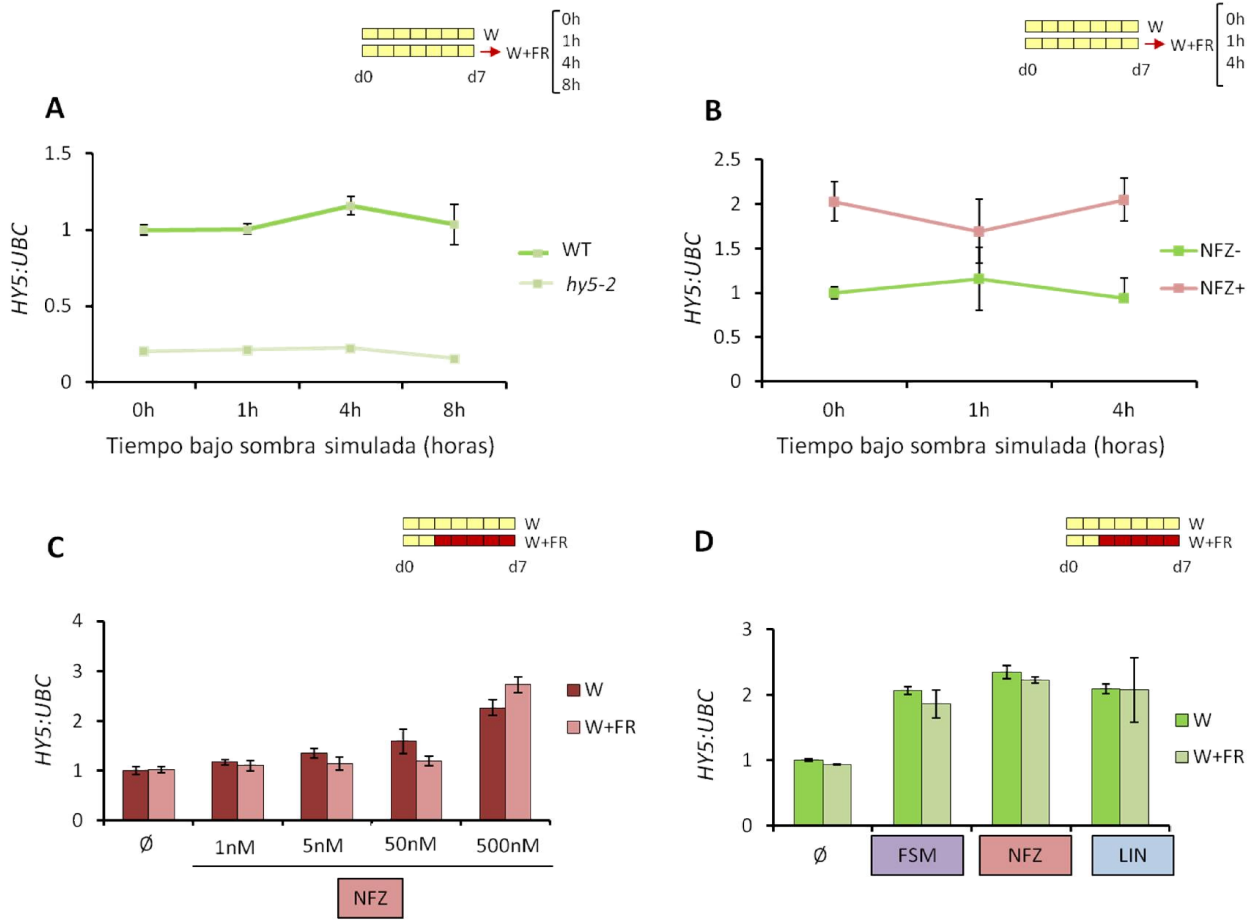


Figura R2.25 Niveles de transcritos de *HY5* en presencia de sombra simulada y inhibidores.

A) PCR cuantitativa (qPCR) de los niveles de transcritos de *HY5* en plantas WT y *hy5-2* crecidas durante 7 días en luz W y tratadas con W+FR durante 1, 4 y 8 horas. El gen *UBC* se utilizó como normalizador y se muestran los niveles de transcritos normalizados al WT en W. Así mismo se muestran las medias y el SE correspondiente a 3 réplicas biológicas (n=3). B) PCR cuantitativa (qPCR) de los niveles de transcritos de *HY5* en plantas WT sembradas en presencia o ausencia de 5 μ M de NFZ. Se crecieron durante 7 días en luz W y se trataron con W+FR durante 1 y 4 horas. Así mismo se muestran las medias y el SE correspondiente a 3 réplicas biológicas (n=3). C) PCR cuantitativa (qPCR) de los niveles de transcritos de *HY5* en plantas WT crecidas durante 2 días en luz W y transferidas durante 5 días en W+FR o W. Las plantas se crecieron en ausencia o presencia de las concentraciones de NFZ descritas en la figura. D) PCR cuantitativa (qPCR) de los niveles de transcritos de *HY5* en plantas WT crecidas como en C y en ausencia o presencia de 5 μ M NFZ, 500 μ M FSM o 1mM LIN. En C y D se representan las medias de los niveles de transcritos en W y W+FR relativos al WT en ausencia de inhibidor en W y el SE correspondiente a 3 réplicas biológicas (n=3). Los asteriscos mostrarían las diferencias significativas en los niveles de transcritos en respuesta a sombra para cada concentración de inhibidor mediante la Prueba t de Student ($p < 0.05$).

Para evaluar la posibilidad de que la sombra regulase la localización o la estabilidad de HY5 en lugar de su transcripción, generamos la construcción *35S:HY5-GFP*, donde se fusionó HY5 a la proteína fluorescente GFP, y se transformó en fondo *hy5-2*. Las líneas transgénicas obtenidas (*35S:HY5-GFP [hy5-2]*) complementan el fenotipo de hipocotilo del mutante, indicando que la proteína HY5-GFP es funcional. HY5 tiene localización

nuclear (Oyama et al. 1997), pero programas de localización de proteína bioinformáticos (www.expasy.org) también predicen su localización en cloroplastos. Para comprobar si el tratamiento con sombra y/o inhibidor (NFZ o LIN) afectaba la localización de HY5-GFP, observamos por microscopía confocal plantas *35S:HY5-GFP [hy5-2]* después de tratarlas con W o W+FR durante 5 días y en presencia o ausencia de inhibidores. Tal y como se puede observar en la (**Figura R2.26**) la proteína HY5-GFP se localiza en el núcleo en todos los casos y no hay diferencias en su localización en función del tratamiento de sombra o en función de la presencia o ausencia de inhibidores.

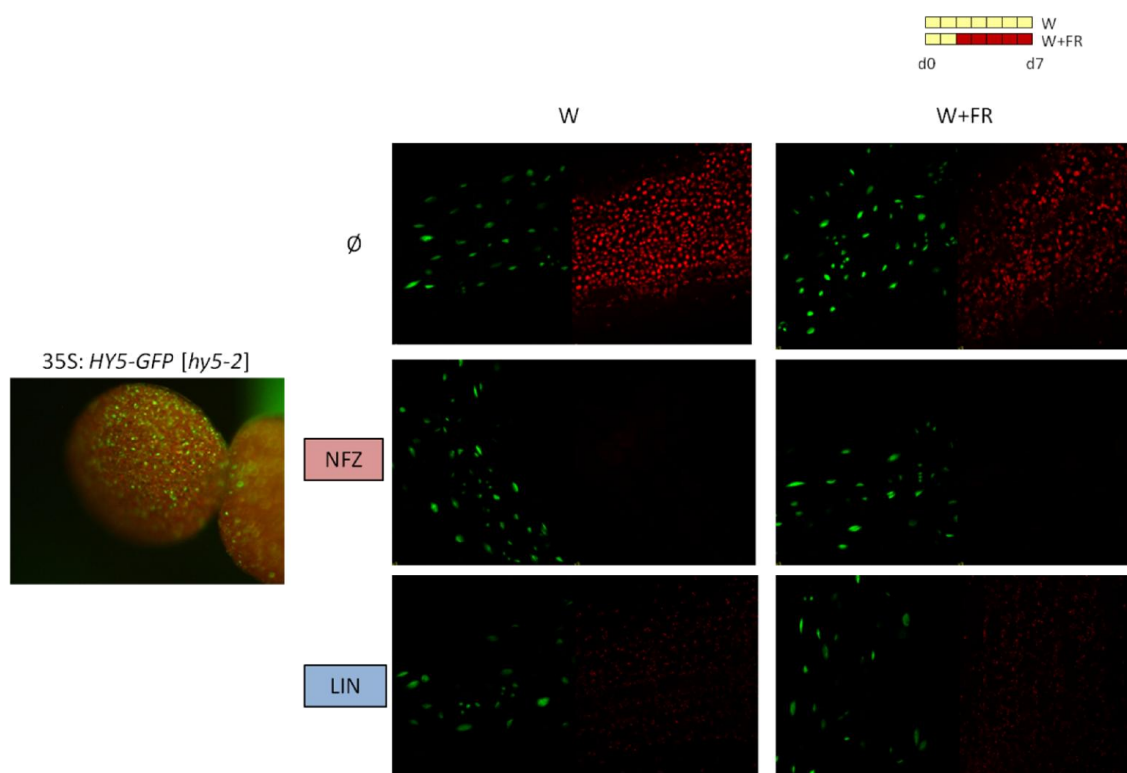


Figura R2.26 Localización de HY5-GFP en presencia de sombra.

Imágenes de microscopía confocal obtenidas a partir de plantas *35S: HY5-GFP [hy5-2]* sembradas en ausencia o presencia de 5 µM o 1mM LIN. Se crecieron durante 2 días en luz W y se transfirieron durante 5 días a W+FR o W. Pasado ese tiempo se realizaron 8 fotografías de cada condición mediante microscopía confocal. Se muestra la autofluorescencia de la clorofila de los cloroplastos así como la fluorescencia de HY5-GFP.

A continuación quisimos determinar si existía una estabilidad diferencial de la proteína en función de las condiciones (ratio R/FR) de la luz. Para ello medimos la cantidad de proteína HY5-GFP por western-blot en plantas crecidas durante 7 días en W y tratadas a diferentes tiempos con W+FR (0h, 3h, 8h, 24h) en presencia o ausencia de NFZ y LIN (**Figura R2.27**).

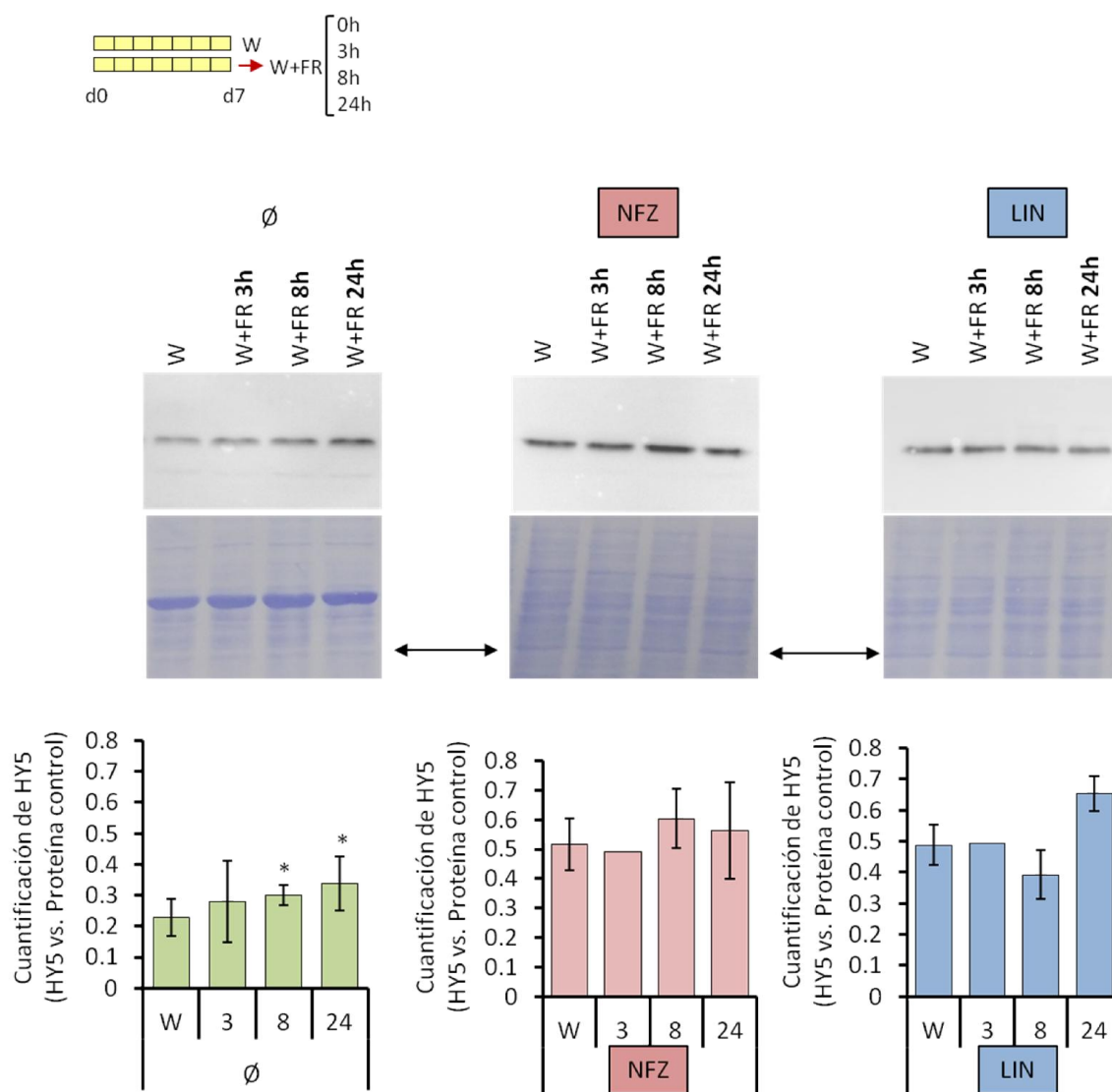


Figura R2.27 Cuantificación de HY5-GFP en presencia de sombra y inhibidores.

Niveles de proteína HY5-GFP (Panel superior). Plantas 35S: *HY5-GFP* [*hy5-2*] se crecieron durante 7 días en W en ausencia o presencia de 5 μ M NFZ o 1mM LIN y fueron transferidas posteriormente a W+FR durante 3h, 8h, 24h. Se cargaron 25 μ g de proteína total y se incubó con α -GFP (1:1000). En el panel inferior se muestra el coomassie. Se cuantificó la proteína HY5-GFP por ImageJ utilizando la proteína control indicada para normalizar los niveles de proteína. Las graficas muestran la media de la cuantificación de HY5 en referencia a la proteína control así como el SE de 5 réplicas independientes en el caso de las plantas sin inhibidor (n=5) y de 3 réplicas independientes en el caso de las plantas con inhibidor (n=3). Los asteriscos muestran las diferencias significativas en los niveles de proteína en respuesta a sombra para cada concentración de inhibidor mediante la Prueba t de Student ($p < 0.05$).

Según nuestros resultados en ausencia de inhibidores hay un incremento significativo ($p < 0.05$) en la cantidad de proteína a lo largo del tratamiento de sombra, mientras que ello no ocurre tan claramente en presencia de NFZ o LIN. Sin embargo, en presencia de NFZ y LIN se observan niveles más elevados de proteína de forma basal

(aproximadamente el doble que en medio sin inhibidores), de forma parecida a lo observado con los niveles de transcrito de *HY5* observados previamente (**Figura R2.25**). Estos resultados confirman que el bloqueo del desarrollo de los cloroplastos activa la expresión de *HY5*, lo que acaba generando más proteína HY5. Dado que HY5 es un represor de la elongación en respuesta a sombra tanto en plantas verdes (**Figura R2.13**) como albinas (**Figura R2.16**), es previsible que la mayor acumulación basal de HY5 en plantas tratadas con NFZ o LIN aumente la capacidad de represión de las respuestas de elongación.

2.4.2 HY5 se acumula en respuesta a sombra para regular la expresión génica

La observación que el tratamiento con sombra aumenta (en lugar de disminuir) los niveles de HY5 en plantas verdes es contraintuitivo, ya que el SAS induce la elongación del hipocotilo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la sombra también induce reguladores positivos de la elongación del hipocotilo (como los PIFs), y es el balance final de reguladores negativos y positivos el que resulta en la respuesta observada. Para estudiar si HY5 mantenía su función represora del alargamiento del hipocotilo por sombra en plantas sin cloroplastos funcionales, analizamos los niveles de transcrito de genes marcadores del SAS (*HFR1*) en plantas WT y *hy5-2* crecidas durante 7 días en luz blanca y expuestas durante 1h a sombra simulada en presencia o ausencia de NFZ y LIN (**Figura R2.28**). Tal y como se espera de un represor como HY5, observamos que la inducción de la expresión de *HFR1* en presencia de W+FR era mayor en el mutante *hy5-2*. Además, esto ocurre tanto en plantas verdes como en plantas crecidas en presencia de NFZ y, en menor medida, LIN, a pesar de que la respuesta a sombra en estas condiciones está muy disminuida (**Figura R2.28**). Estos resultados sugieren que HY5 conserva su función en ausencia de cloroplastos funcionales.

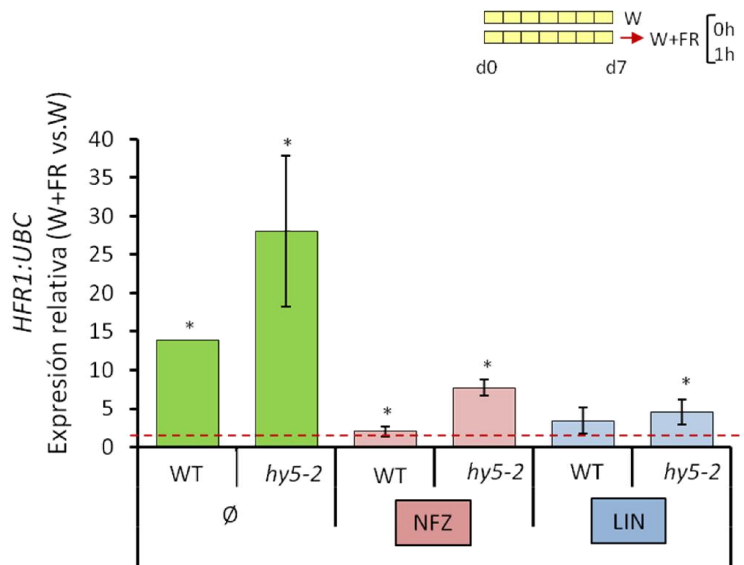


Figura R2.28 Respuesta molecular a sombra en presencia o ausencia de HY5 y en plantas tratadas con inhibidores

PCR cuantitativa (qPCR) de los niveles de transcrito de *HFR-1* en plantas WT y *hy5-2* crecidas en 5µM de NFZ, 1mM LIN o en ausencia de inhibidor durante 7 días en luz W y tratadas con W+FR durante 1 hora. Las barras muestran el ratio de los niveles de transcrito en luz W+FR vs. niveles de transcrito en W para cada tiempo y inhibidor. Así mismo se muestra el SE propagado del ratio de la SE en W+FR vs. la SE en W correspondiente a cada tratamiento de 3 réplicas biológicas (n=3). Los asteriscos muestran las diferencias significativas en los niveles de transcrito en respuesta a sombra para cada inhibidor mediante la Prueba t de Student ($p < 0.05$).

La función principal de un factor de transcripción es unirse a sus promotores diana para regular la expresión de los correspondientes genes. Una hipótesis alternativa para explicar por qué los niveles de HY5 aumentan en plantas verdes tras la exposición a W+FR es que la sombra podría inhibir la unión de HY5 a sus promotores diana, causando de esta manera una menor actividad biológica de la proteína y promoviendo así la elongación celular. Con tal de evaluar esta posibilidad y determinar si hay una mayor o menor unión de HY5 a sus promotores diana en función de las condiciones de luz, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Crecimos plantas *35S:HY5-GFP [hy5-2]* durante 7 días en W o 2 días en W y 5 días en W+FR, y estudiamos la unión de HY5 a promotores de genes previamente publicados en la literatura como dianas directos de este factor de transcripción (**Figura R2.29**). En concreto, seleccionamos (1) genes que se sabe que son reprimidos directamente por HY5 y que promueven el alargamiento del hypocotilo como inductores de la respuesta a auxinas: *HAT2 (HOMEBOX ARABIDOPSIS THALIANA 2)* (Sawa et al. 2002; Sibout et al. 2006), *EXP2 (EXPANSIN 2)*, *XTH5 (ENDOTRANSGLUCO- SYLASE/HYDROLASE 5)*, *XTH21 (ENDOTRANSGLUCO- SYLASE/HYDROLASE 21)* (Xu et al. 2016; Lin et al. 2016); (2) genes que son activados por HY5 y que reprimen la respuesta a auxinas: *IAA7 (AUXIN RESISTANT 2 (AXR2)/INDOLE ACETIC ACID 7)* (Cluis et al. 2004); y (3) genes relacionados

con señalización retrógrada que son regulados positivamente por HY5: *GUN5* (*GENOMES UNCOUPLED 5*) (Toledo-Ortiz et al. 2014).

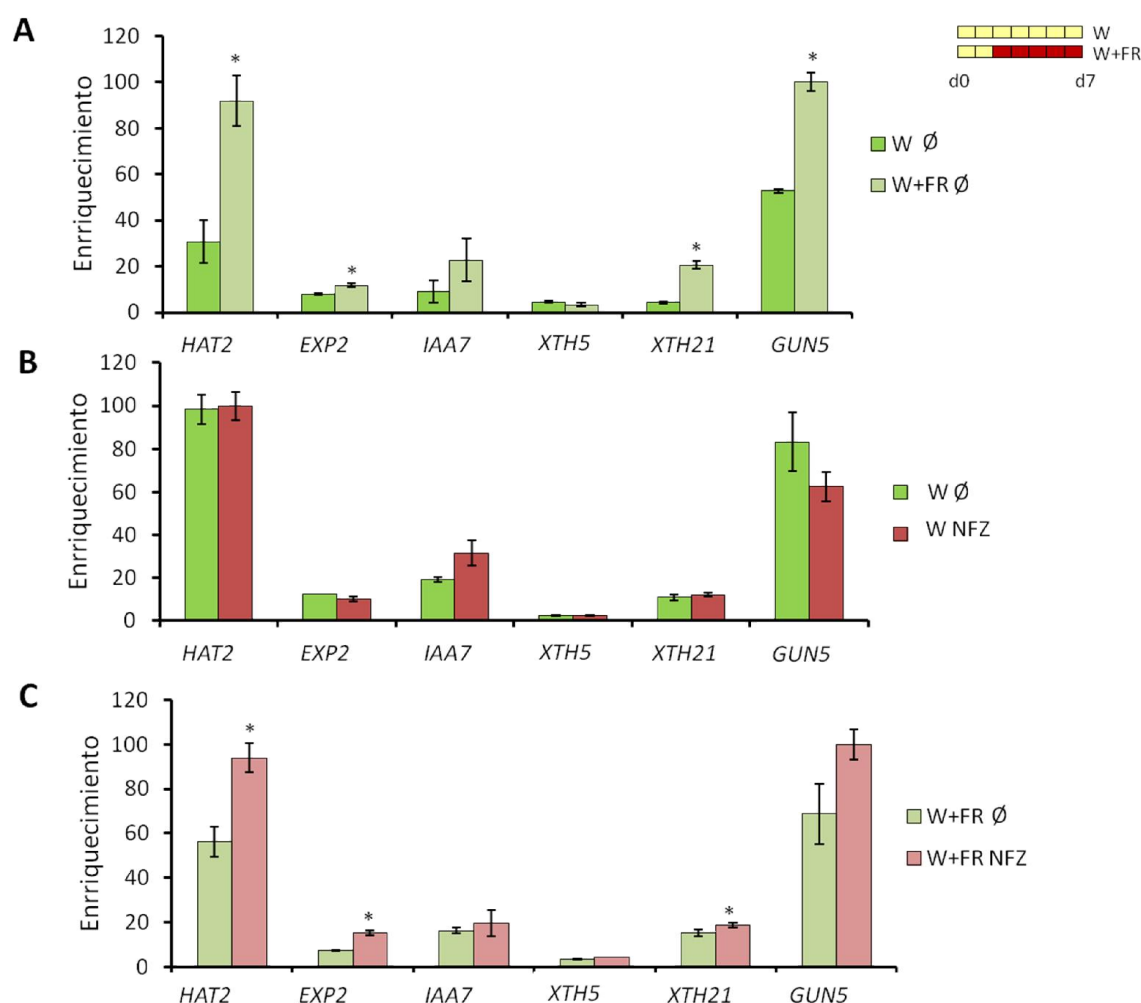


Figura R2.29 ChIP de HY5-GFP en presencia de sombra y inhibidores.

Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina para determinar la unión diferencial de HY5 a sus promotores diana *HAT2*, *EXP2*, *IAA7*, *XTH5*, *XTH21* y *GUN5*. A) Se crecieron plantas 35S:HY5-GFP [hy5-2] durante 2 días en luz W y 5 días en luz W o W+FR sin inhibidor. Las columnas representan la media y el SE de 2 réplicas biológicas. B) Se sembraron plantas 35S:HY5-GFP [hy5-2] con o sin 5 μM de NFZ y se crecieron durante 7 días en luz W. Las columnas representan la media y el SE de 2 réplicas técnicas. C) Se sembraron plantas 35S:HY5-GFP [hy5-2] con o sin 5 μM de NFZ y se crecieron durante 2 días en luz W y 5 días en luz W+FR. Las columnas representan la media y el SE de 2 réplicas técnicas. Tanto en A, B y C la inmunoprecipitación se realizó mediante el anticuerpo α-GFP. Se realizó un control sin anticuerpo en paralelo en cada caso. El ADN inmunoprecipitado se analizó mediante qPCR usando oligonucleótidos específicos cubriendo los sitios de unión de HY5 en los genes testeados. Los resultados se representan como el enriquecimiento de transcritos de cada gen después de normalizar respecto al input y al control sin anticuerpo. Los asteriscos muestran las diferencias significativas en la diferencia de unión entre los dos tratamientos en respuesta a sombra mediante la Prueba t de Student (p < 0.05).

Nuestros resultados muestran que HY5 se une diferencialmente a los promotores en función de la presencia o ausencia de sombra. En concreto, presenta más unión en

sombra de forma significativa ($p < 0.05$) a los promotores de *HAT2*, *EXP2*, *XTH21* y *GUN5*, mientras que no es tan claro en el caso de *XTH5* o *IAA7* (**Figura R2.29A**). Por lo tanto, esto se correlaciona con la mayor acumulación de HY5 en respuesta a sombra observada en la **Figura R2.27**. Es por tanto posible que haya más unión de HY5 a estos promotores debido a que también hay un incremento en la cantidad de proteína, y no tanto por una cuestión de afinidad. Sin embargo, la unión de HY5 a sus promotores diana en medio suplementado con NFZ es similar a lo que ocurre en plantas crecidas sin inhibidor y expuestas a W (**Figura R2.29B**), lo que no cuadra con los mayores niveles de proteína HY5 detectada en plantas tratadas con inhibidor (**Figura R2.27**). Sí que encontramos más unión de HY5 a sus promotores diana (*HAT2*, *EXP2* y *XTH21*) en plantas crecidas en sombra en presencia de NFZ respecto a las no tratadas con NFZ (**Figura R2.29C**), indicando que HY5 parece tener más actividad en presencia de sombra e inhibidor. Estos resultados sugieren que la regulación de la represión de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra es compleja y multifactorial, y que probablemente HY5 actúa conjuntamente con otros actores regulando la respuesta. A la vista de nuestros datos y en base a lo ya propuesto por otros autores, proponemos que la sombra implica mecanismos de tipo “gas and brake” (aceleración y freno), induciendo tanto activadores como represores de la elongación del hipocotilo. Si aumentan los niveles de HY5 (por ejemplo, al tratar con NFZ), la balanza se inclina hacia la represión y se inhibe la elongación del hipocotilo.

2.4.3 Ni HY5 ni el ABA afectan a la percepción de la sombra por phyB

Al contrario de lo que ocurre en plantas WT verdes, en las plantas tratadas con NFZ o LIN los niveles de proteína HY5 no aumentan en respuesta a sombra (**Figura R2.27**), lo que es consistente con nuestra observación anterior de que la percepción de sombra medida por fitocromos es defectuosa en plantas tratadas con estos inhibidores (**Figura R2.11**). Con tal de estudiar la posibilidad de que HY5 sea capaz a su vez de modular la actividad del phyB, se introdujo la construcción *35S:PHYB-GFP* en fondo *hy5-2* para comparar la dinámica de inactivación (localización nuclear) de phyB-GFP en la línea *35S:PHYB-GFP [hy5-2]* con la de plantas *35S:PHYB-GFP* de fondo WT (**Figura R2.11**). Crecimos plantas *35S:PHYB-GFP* y *35S:PHYB-GFP [hy5-2]* durante 7 días en W en presencia o ausencia de NFZ o LIN y las tratamos con un pulso de FR (**Figura R2.30**).

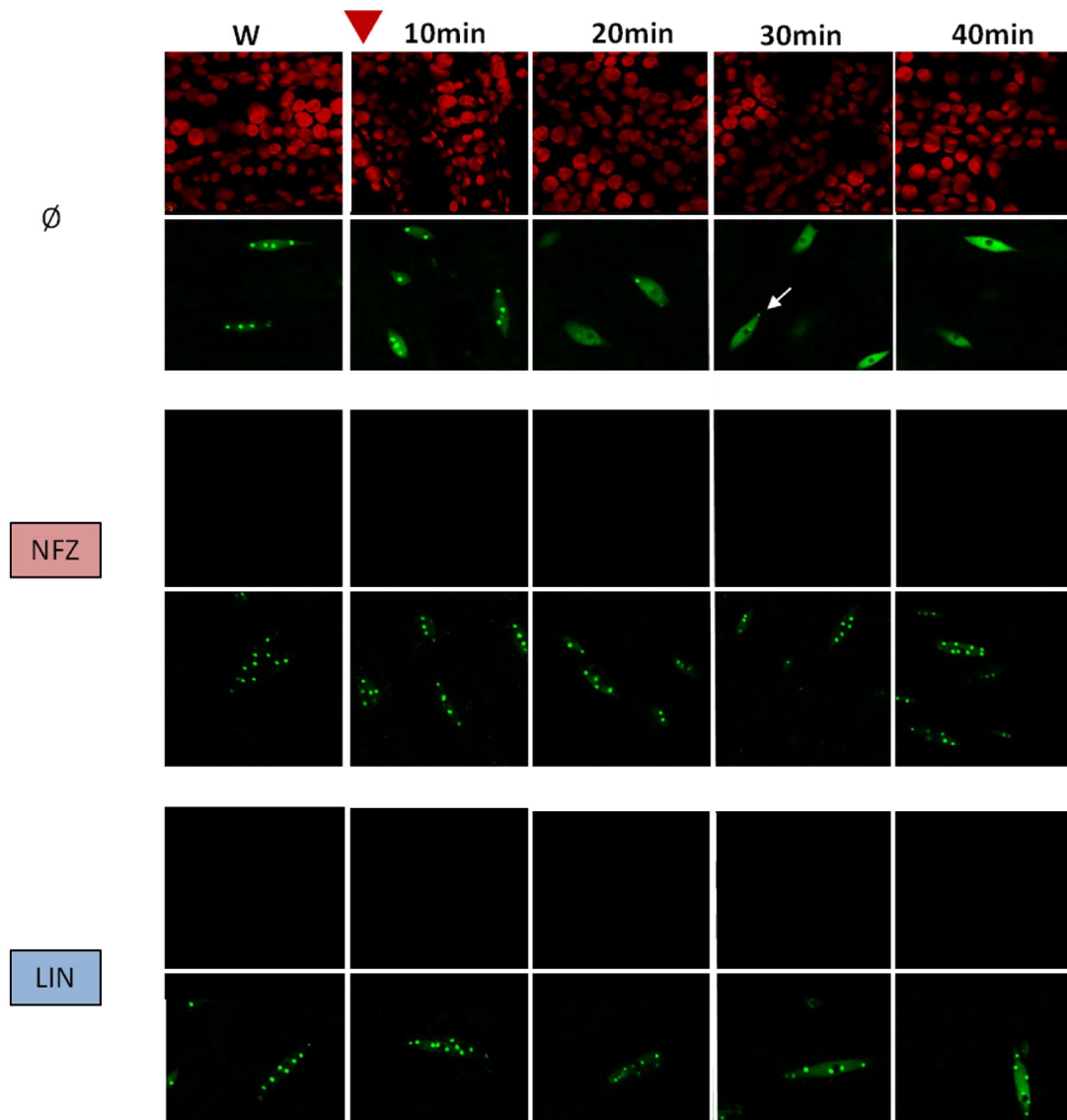


Figura R2.30 Patrón de inactivación del phyB en ausencia de HY5 y en plantas tratadas con inhibidores

Se crecieron plantas 35S:phyB-GFP [*hy5-2*] en presencia o ausencia de 5µM NFZ o 1mM LIN durante 7 días en W a 22 °C. Posteriormente, se irradiaron durante 5 minutos con FR y se realizaron fotografías sucesivas mediante microscopía confocal de la región apical del hypocotilo en presencia de oscuridad a 10, 20, 30 y 40 minutos de un total de 10 muestras por cada punto (n=10). Se presentan fotografías representativas de cada punto.

A continuación capturamos imágenes en oscuridad a diferentes tiempos y clasificamos la localización de phyB-GFP en los núcleos de la misma manera que lo realizamos en la **Figura R2.11**. Nuestros resultados muestran que la ausencia de HY5 no altera la dinámica de inactivación de phyB-GFP en respuesta a FR (**Figura R2.31**). Tanto en fondo WT como en fondo *hy5-2* la localización de phyB-GFP es similar en plantas verdes y en ambos fondos el tratamiento con inhibidores inhibe su inactivación de forma similar. Por lo tanto, nuestros datos permiten concluir que HY5 no afecta a la actividad del phyB de forma significativa.

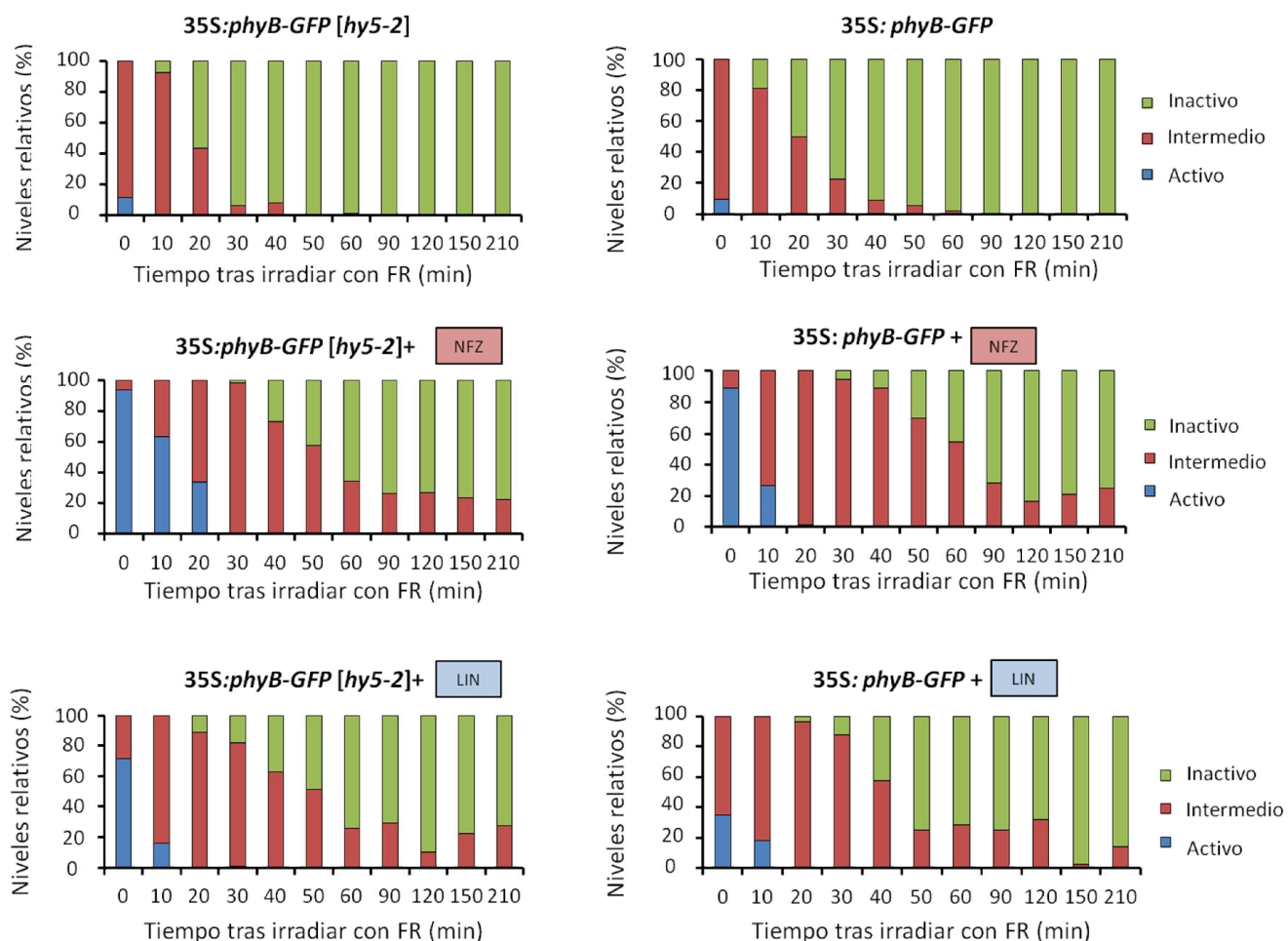


Figura R2.31 Resultados cuantitativos de la inactivación del phyB en ausencia de HY5 y en plantas tratadas con inhibidores

Plantas 35S:phyB-GFP [hy5-2] se trataron según la Figura R2.30 y se realizaron fotografías en oscuridad mediante microscopía confocal en los tiempos indicados. Posteriormente, se clasificó el estado de actividad de los núcleos como en la Figura R2.10. En las gráficas se representa el % de núcleos de un total de 90 núcleos contabilizados por cada punto de tiempo y condición pertenecientes a 10 muestras biológicas independientes (n=10). También se muestran las gráficas de la Figura R2.11 a modo comparativo.

Debido a que el ABA es un potente inhibidor de la respuesta a sombra, quisimos caracterizar si la actividad de phyB se altera en presencia de ABA. Para ello sembramos plantas 35S:PHYB-GFP durante 7 días en luz W en presencia o ausencia de ABA, y en presencia o ausencia de NFZ y LIN. Pasado este tiempo realizamos fotografías mediante microscopía confocal y contabilizamos los núcleos en función de su actividad, tal y como se describe en el párrafo anterior. Según nuestros resultados (**Figura R2.32**) el ABA parece no afectar a la actividad del phyB, ya que no se observan grandes cambios en la distribución nuclear de phyB-GFP entre muestras tratadas o no con la hormona. Por lo tanto la represión de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra por parte de ABA no se debe a una interferencia con la percepción de la señal sino que seguramente ocurre aguas abajo de la respuesta del fitocromo.

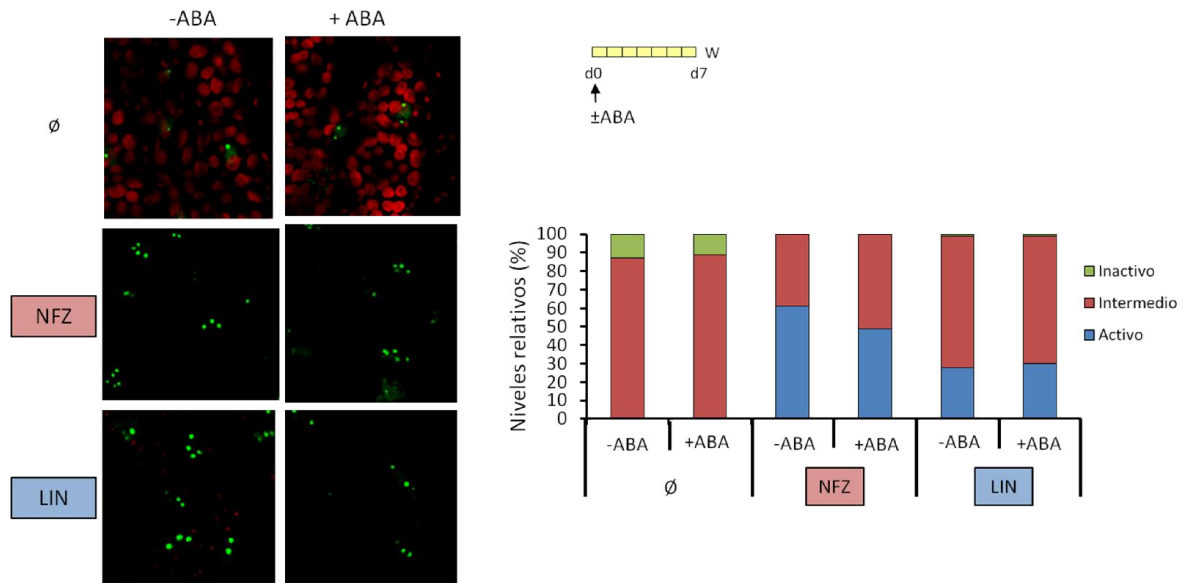


Figura R2.32 Respuesta molecular a sombra en presencia o ausencia de HY5 y en plantas tratadas con inhibidores

Imágenes de microscopía confocal a partir de plantas 35S:phyB-GFP en presencia o ausencia de 0.02 μ M de ABA y presencia o ausencia de 5 μ M de NFZ, 1 mM LIN crecidas durante 7 días en W. Se muestran imágenes de 35S:phyB-GFP de la región apical del hypocotilo superpuestas con la autofluorescencia de los cloroplastos. Posteriormente, se clasificó el estado de actividad de los núcleos como en la Figura R2.11. En las gráficas se representa el % de núcleos de un total de 80 núcleos contabilizados por cada punto de tiempo y condición pertenecientes a 8 muestras biológicas independientes (n=8).

Discusión

Discusión

1. La sombra regula la síntesis de carotenoides mediante vías primarias de señalización lumínica.

Durante las respuestas adaptativas relacionadas con luz, la planta necesita compensar su metabolismo para responder de forma óptima a su entorno. Como respuesta fisiológica, la síntesis de carotenoides consume energía en la planta, con lo que tiene que estar altamente regulada en función de las prioridades de la planta. Así, en elevadas intensidades lumínicas o cuando plantas crecidas en oscuridad son iluminadas por primera vez (tal y como ocurre durante la desetiolación) hay una inducción de la síntesis de carotenoides para proteger a los cloroplastos de la fotooxidación (Toledo-Ortiz et al. 2010). Sin embargo, en condiciones de sombra disminuye la radiación incidente y la síntesis de carotenoides se reprime con tal de economizar energéticamente y así potenciar otras respuestas adaptativas como la elongación del hipocotilo.

1.1 PIFq (pero no PIF7) reprimen la biosíntesis de carotenoides en respuesta a sombra.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con sombra simulada (W+FR) produce una disminución en la síntesis de carotenoides en plantas WT (**Figura R1.1A, B**), tal y como se demostró previamente (Roig-Villanova et al. 2007). Esta disminución es detectable a tan solo 12h después de la exposición a sombra (**Figura R1.1E**). Esto demuestra que la regulación de los niveles de carotenoides durante el SAS sucede con relativa rapidez, aunque más lentamente que durante la desetiolación (Toledo-Ortiz et al. 2010), sugiriendo que la agilidad en la regulación de la biosíntesis de carotenoides es importante para la adaptación de la planta a fluctuaciones lumínicas. Debido a que la represión en la síntesis de carotenoides (durante el SAS) o su inducción (durante la desetiolación) ha de ser ágil, tiene sentido que estén regulados directamente por PIFs. Observamos que el mutante *pifq* no mostraba una disminución en la síntesis de carotenoides ni en tratamientos largos de sombra (días) ni cortos (horas), mientras que el mutante *pif7-2* conservaba el mismo comportamiento que el WT (**Figura R1.1A,C,E**). A su vez, la presencia de elevado contenido de carotenoides del mutante *pifq* en comparación con el WT es consistente con el rol propuesto para las proteínas PIFq como represoras de la biosíntesis de carotenoides (Toledo-Ortiz et al. 2010; Toledo-Ortiz et al. 2014). El fenotipo de los mutantes indica que la actividad de los PIFs fotosensibles se requiere para reprimir la acumulación de carotenoides en presencia

de bajos ratios R/FR, mientras que PIF7 que es fotoestable, no parece estar implicado en esta represión.

De forma consistente con observaciones anteriores de nuestro laboratorio (Toledo-Ortiz et al. 2010), hemos observado que los niveles de transcritos de *PSY* también disminuyen en el WT 12h después de la exposición a sombra (**Figura R1.D**). Lo mismo ocurre con el mutante *pif7-2*. En cambio el mutante *pifq* (que muestra niveles constitutivamente mayores de transcritos de *PSY* tal y como había anticipado (Toledo-Ortiz et al. 2010)) muestra un incremento en los niveles de *PSY* en tan solo 1h tras la exposición a W+FR seguido de una disminución de transcritos de *PSY* hasta llegar a alcanzar los niveles presentes en el WT al cabo de 8h (**Figura R1.D**). Este hecho contrasta con la ausencia de cambios en el nivel de carotenoides observados al exponer a sombra plantas *pifq*. Una posible explicación podría ser que la proteína *PSY* sea más estable (por ejemplo, porque su degradación sea más lenta) en ausencia de las proteínas PIFq. Otra posibilidad sería que la elevada actividad de PIFq en las plantas WT que crecen en ratios bajos de R/FR, puede acabar resultando en una acumulación reducida de carotenoides de manera independiente a *PSY*. Consistentemente, las proteínas PIFq actúan como represoras del desarrollo de los cloroplastos y de sus estructuras fotosintéticas (Leivar et al. 2008a; Leivar & Quail 2011; Zhang et al. 2013b), induciendo así una disminución en la capacidad de almacenaje de los carotenoides. Con estos experimentos, concluimos que las proteínas PIFq pero no PIF7 reprimen la expresión de *PSY* en los primeros estadios de la respuesta a sombra, mientras que a más largo plazo se da una represión en la cantidad de carotenoides por mecanismos que no requieren necesariamente del control de la expresión de *PSY*.

1.2 HY5 no regula la biosíntesis de carotenoides en respuesta a sombra.

Las respuestas del SAS se regulan de forma precisa mediante un equilibrio entre activadores y represores (Martínez-García et al. 2010; Franklin 2008; Casal 2013). HY5 actúa como antagonista de los PIFs en un gran número de respuestas fisiológicas, incluyendo la inducción por luz de la elongación del hipocotilo y la biosíntesis de carotenoides (Kami et al. 2010; Lau & Deng 2010; Leivar & Quail 2011; Chen et al. 2013; Toledo-Ortiz et al. 2014). Consistentemente, según nuestros resultados el mutante *hy5-2* presenta unos niveles constitutivamente menores de carotenoides que el WT. Sin embargo, la disminución en la síntesis de carotenoides durante el SAS ocurre de forma similar en plantas WT y *hy5-2* (**Figura R1.2B**). Este mutante también tiene un fenotipo WT en cuanto a la disminución en los niveles de transcritos de *PSY* durante el tratamiento de sombra (**Figura R1.2A**). Según Ciolfi et al. 2013 HY5 forma parte de la respuesta tardía a sombra, ya que el correspondiente gen se encuentra inducido sutilmente tras varias horas de exposición a sombra (**Figuras R1. 2C y R2.**

28A). Nuestros resultados indica que si bien HY5 está implicado en la regulación de *PSY* y la carotenogénesis junto con los PIFs durante la desetiolación (Toledo-Ortiz et al. 2010), esto no parece ocurrir durante el SAS. Este es un ejemplo de cómo un mismo proceso, la regulación de la biosíntesis de carotenoides, requiere de diferentes protagonistas dependiendo de la respuesta adaptativa desencadenada.

1.3 PAR1 es un regulador positivo de la síntesis de carotenoides mediante su interacción con PIFs

Tanto PAR1 como HFR1 actúan como antagonistas de los PIFs en respuestas relacionadas con la elongación del hipocotilo durante el SAS (Sessa et al. 2005; Roig-Villanova et al. 2006b; Hornitschek et al. 2009). Además se ha comprobado su capacidad de heterodimerizar con factores de transcripción tipo bHLH verdaderos como los PIFs, evitando de esta manera su unión a promotores (Hornitschek et al. 2009; Galstyan et al. 2011; Hao et al. 2012; Cifuentes-Esquivel et al. 2013; Shi et al. 2013). Tanto PAR1 como HFR1 están codificados por genes que se activan en respuesta a un bajo ratio R/FR (Hao et al. 2012; Galstyan et al. 2011). En nuestro caso, observamos su inducción tan solo 1h después de la exposición a W+FR (Bou-Torrent, Toledo-Ortiz & Ortiz-Alcaide 2015) a diferencia de *HY5*, cuya respuesta es más tardía y su aumento no es significativo en nuestras condiciones lumínicas (**Figuras R1.2C y R2.25A**) (Ciolfi et al. 2013). Dado que no se observan diferencias en los niveles de carotenoides en la línea sobreexpresora de la versión truncada de HFR1-GFP (Galstyan et al. 2011) en comparación a la línea WT (**Figura R1.3A**), podemos concluir que HFR1 no está implicado en la regulación de la biosíntesis de carotenoides. En el caso de PAR1, hay grandes similitudes entre el comportamiento de la línea sobreexpresora PAR1-GFP (Roig-Villanova et al. 2007) y el mutante *pifq* tanto en la cinética del perfil de carotenoides, como en la cinética del perfil de transcritos *PSY* durante el tratamiento en W+FR (comparar **Figuras R1.1** con **R1.3**). Además, si bien la expresión de *PAR1* se induce de forma rápida como *HFR1*, tiene un máximo de expresión al cabo de tan solo 1h después de la exposición a W+FR (Bou-Torrent, Toledo-Ortiz & Ortiz-Alcaide 2015) recordando a la cinética de respuesta a sombra del gen *PSY* en el mutante *pifq* (**Figura R1.1D**). Estos resultados apoyan la conclusión de que las proteínas PAR1 y PIFq contribuyen de forma antagonista a la regulación de la acumulación de carotenoides tanto en condiciones lumínicas normales (alto R/FR) como en respuesta a sombra. Sin embargo, este efecto antagonista no ocurre en oscuridad, donde los niveles de pigmentos en plantas sobreexpresoras PAR1-GFP son muy similares al WT (Bou-Torrent, Toledo-Ortiz & Ortiz-Alcaide 2015) mientras que en los mutantes *pifq* los niveles están aumentados (Toledo-Ortiz et al. 2010). Una posible explicación de esto, es que PAR1-GFP a diferencia de las proteínas PIFq, se degrada en oscuridad vía COP-1 (Zhou et al. 2014).

Estudios anteriores de nuestro laboratorio han reportado que PIF1 es un represor de la expresión de *PSY* (Toledo-Ortiz et al. 2010) y que PAR1 previene la unión de PIF1 al promotor de este gen, impidiendo su actividad transcripcional (Bou-Torrent, Toledo-Ortiz & Ortiz-Alcaide 2015). PIF1 interacciona tanto con HFR1 como PAR1 pero solo PAR1 tiene un efecto en la regulación de la síntesis de carotenoides. Esto sugiere que los módulos HFR1-PIF1 y PAR1-PIF1 regulan respuestas fisiológicas específicas dentro del SAS (por ejemplo la síntesis de carotenoides en el caso de PAR1-PIF1) pero que en ocasiones corregulan respuestas comunes (por ejemplo la elongación del hipocotilo). También es posible que la interacción de HFR1 o PAR1 con otros factores de transcripción tipo bHLH proporcione especificidad en la regulación molecular de otras respuestas fisiológicas dentro del SAS.

1.4 PAR1 interacciona con otros factores de transcripción para regular la biosíntesis de carotenoides en sombra

En un cribado por Y2H (Cifuentes-Esquivel et al. 2013) se encontraron 28 proteínas interactoras de PAR1 que correspondían a 8 de las 12 subfamilias descritas de bHLH (Bou-Torrent, Toledo-Ortiz & Ortiz-Alcaide 2015). Estudios previos han demostrado a nivel experimental la interacción de PAR1 con los miembros de las subfamilias VIII (PIFs y HFR1), VIII (PAR1 y PAR2), y XII (BRASSINOSTEROID ENHANCED EXPRESSION1 [BEE1], BEE2, and BEE3), entre otras (Carretero-Paulet et al. 2010; Hao et al. 2012; Cifuentes-Esquivel et al. 2013). Aunque PAR1 parece presentar una gran versatilidad en su capacidad de heterodimerización con diferentes proteínas de la familia bHLH, podemos deducir una cierta preferencia por proteínas de la subfamilia XII por dos observaciones. La primera es que la mayor parte de los miembros de esta subfamilia (12 de 16) se encontraron como interactores de PAR1 en el cribado de Y2H (Bou-Torrent, Toledo-Ortiz & Ortiz-Alcaide 2015). La segunda es que el número de clones aislados por Y2H fue mayor para los miembros de esta subfamilia. Por el contrario, HFR1 parece unirse preferentemente a PIFs (es decir, miembros de su propia subfamilia) (Bou-Torrent, Toledo-Ortiz & Ortiz-Alcaide 2015).

La mayor promiscuidad de PAR1 para unirse con bHLHs de distintas subfamilias sugiere que el impacto sobre la expresión de *PSY* y la acumulación de carotenoides causada por el aumento de los niveles de PAR1 (pero no por HFR1) podría estar mediada por factores de transcripción bHLH no-PIF que interaccionan con PAR1 pero no con HFR1. En concordancia con esta conclusión, observamos un pico en la expresión del gen *PAR1* tempranamente (1h) después del tratamiento con W+FR que coincide con una inducción similar del nivel de transcritos de *PSY* en ausencia de PIFq (Bou-Torrent, Toledo-Ortiz & Ortiz-Alcaide 2015). Este hecho nos hizo pensar en la posibilidad de la existencia de otros participantes en la represión de *PSY* a parte de los PIFs.

Para identificar otros represores transcripcionales involucrados en la regulación de la expresión de *PSY* junto con PAR1 nos focalizamos en los genes de la subfamilia XII que se inducen rápidamente en presencia de bajo R/FR. Análisis de microarrays mostraron que la expresión de varios interactores de PAR1 cambiaba en respuesta al tratamiento de sombra. En concreto, además de *BHLH044/BEE1* (At1g18400), *BHLH058/BEE2* (At4g36540), y *BHLH050/BEE3* (At1g73830), también cambiaba la expresión de *BHLH060* (At3g57800), *BHLH062* (At3g07340), *BHLH064* (At2g18300), *BHLH074* (At1g10120), y *BHLH078* (At5g48560) (Carabelli et al. 2007; Ciolfi et al. 2013a; Franklin & Whitelam 2007; Tao et al. 2008). De estas proteínas interactoras de PAR1 buscamos mutantes knock-out que mostraran cambios en los niveles de transcritos de *PSY*, con tal de encontrar aquellas proteínas implicadas en la regulación de *PSY* y por tanto en la síntesis de carotenoides. Según nuestros resultados tanto el mutante *bHLH78* como el mutante *bHLH60* presentan cambios en los transcritos de *PSY* (**Figuras R1.4 y R1.5**). En ambos casos podemos observar que los niveles de transcritos de *PSY* están incrementados en W respecto a las plantas WT, como se espera en el caso de represores transcripcionales. En el mutante *bHLH78* encontramos niveles de transcrito hasta 2.5 veces más elevados en plantas adultas, lo que hace pensar que las plantas adultas pueden tener mecanismos mucho más bruscos en la compensación de los niveles de carotenoides que las plántulas jóvenes (**Figura R1.4D**). De hecho, estudios previos han demostrado que existen diferencias entre el funcionamiento de los mecanismos de fotoprotección entre plantas de diferente edad (Bonfils et al. 2000). Por ejemplo el ciclo de las xantofilas es utilizado como mecanismo de fotoprotección de forma preferente en hojas maduras, pero en cambio su importancia no parece ser tan relevante en hojas jóvenes, que podrían utilizar otros mecanismos compensatorios (Bonfils et al. 2000). En ambos mutantes observamos además que el tratamiento de sombra provoca una disminución en los niveles de transcritos de *PSY* hasta alcanzar los mismos niveles que en el WT (**Figura R1.4C**), lo que nos recuerda al fenotipo del mutante *pifq* (**Figura R1.1D**). Estos resultados nos sugieren que las proteínas BHLH78 y BHLH60 actúan como represoras de la transcripción de *PSY* en condiciones de luz W, y que estarían implicadas en el control de la transcripción de *PSY* de forma similar a como lo hace PIFq.

Al contrario que lo observado para los niveles de *PSY*, el contenido de carotenoides mostró comportamientos distintos en ambos mutantes. El mutante *bHLH78* tiene unos niveles de carotenoides menores al WT (**Figura R1.4A, B**), que no se correspondería con la mayor inducción de *PSY*. Esto podría ser debido a múltiples causas, entre ellas que BHLH78 promueva la estabilidad de los transcritos o de la proteína *PSY*, o bien que promueva el almacenaje y estabilidad de los carotenoides. De hecho, en el caso de este mutante el incremento en la cantidad de transcritos de *PSY* podría ser una consecuencia indirecta de la poca estabilidad de *PSY* o de los carotenoides, en lugar de ser una consecuencia directa de la pérdida de función de un regulador negativo

directo. Por otra parte, el mutante *bHLH60* presenta una mayor cantidad de carotenoides que el WT, y además este contenido de carotenoides no presenta cambios significativos después del tratamiento con W+FR (**Figura R1.5**). Estas características son similares al fenotipo de *pifq* (**Figura R1.1**), lo que sugiere que BHLH60 podría tener un rol represor muy similar a PIFq en la regulación de la síntesis de carotenoides. Cuando observamos otras respuestas asociadas al SAS, como la elongación del hipocotilo, tanto el mutante *bHLH78* como *bHLH60* presentan una respuesta menor que el WT (**Figuras R1.4E y R1.5D**), siendo esta represión mucho más evidente en el caso de *bHLH60*. Esto confirmaría la diferente funcionalidad de las proteínas BHLH78 y BHLH60 en la respuesta a sombra, cuantificada tanto como la represión de la biosíntesis de carotenoides como en inducción de la elongación del hipocotilo.

El fenotipo del mutante *bHLH60* (**Figura R1.5A**) es muy similar al fenotipo observado en las líneas sobreexpresoras de PAR1 o PAR2 (Roig-Villanova et al. 2007; Hao et al. 2012). Además de presentar un fenotipo enano, estas líneas también presentan una mayor acumulación de carotenoides y una mayor represión de la elongación del hipocotilo (Roig-Villanova et al. 2007). Esto podría indicar que BHLH60 está implicada en la respuesta a sombra mediada por PAR1. A su vez, el fenotipo de las plantas que sobreexpresan PAR1 o que carecen de BHLH60 recuerda al de mutantes deficientes en la síntesis, percepción, o transducción de señal de brasinoesteroides, como el del mutante para el gen *BRASSINOESTEROID INSENSITIVE 1* (*bri-1*), que funciona como receptor de los brasinólidos y por tanto es esencial para la vía de transducción de señal dependiente de estas hormonas (Clouse et al. 1996; Arch et al. 2001). Existen múltiples pruebas del rol de PAR1 en la señalización de brasinoesteroides. Mediante el análisis global de perfiles de transcritos de plantas WT y líneas sobreexpresoras de PAR1 se identificaron como dianas directas de PAR1 genes relacionados con la respuesta a auxinas y brasinoesteroides como *SMALL AUXIN UPREGULATED 68* (*SAUR68*), que se encuentra sobrerregulado en presencia de auxinas y/o brasinoestreroides (Goda et al. 2004). Además, PAR1 puede corregular junto a PIF4 la expresión del gen *PACLOBUTRAZOL RESISTANCE1* (*PRE1*) (Hao et al. 2012), que codifica para otra proteína bHLH sin dominio de unión a DNA implicada en la vía de señalización de giberelinas y de brasinoesteroides (Wang et al. 2009; Zhang et al. 2009). PAR1 puede asimismo interactuar con otras bHLH también pertenecientes a la subfamilias XII (BEE1, 2 y 3) y V (BES 1-INTERACTING MYC-LIKE1, BIM1) implicadas en la regulación de la respuesta de brasinoesteroides (Cifuentes-Esquivel et al. 2013). Los mutantes deficientes en estas proteínas presentan un fenotipo similar al mutante *bHLH60*, incluida una inducción atenuada de la elongación del hipocotilo en sombra (Cifuentes-Esquivel et al. 2013). En conjunto, nuestros resultados sugieren que PAR1 es un antagonista de BHLH60 y que ambos podrían actuar como un modulo de regulación en la integración de las señales provenientes de los fitocromos con las vías de señalización

hormonal implicada en la respuesta de brasinoesteroides. La implicación de los brasinosteroides en la regulación de la carotenogénesis no ha sido aún estudiada.

1.5 Un modelo para la regulación de la síntesis de carotenoides en respuesta a sombra

Poco después de la percepción de luz enriquecida en FR, las plántulas de *Arabidopsis* reprimen la producción de carotenoides. La percepción de la señal de sombra induce la actividad de los PIFs (mediante la acumulación de las proteínas PIFq y la defosforilación de PIF7), que son inductores de algunas respuestas SAS, incluyendo la elongación del hipocotilo (Leivar et al. 2012b; Li et al. 2012; Lorrain et al. 2008). Nuestros datos muestran que las proteínas PIFq (pero no PIF7) son además represoras de la expresión de *PSY* y de la biosíntesis de carotenoides (**Figura R1.1**). Además de la estimulación de la actividad de los PIFs y de otros activadores del SAS, la percepción de un bajo ratio R/FR resulta en una fuerte sobrerregulación de genes que codifican para antagonistas (represores) del SAS, entre los que se incluyen los cofactores de transcripción PAR1 y HFR1 (Sessa et al. 2005; Roig-Villanova et al. 2006; Roig-Villanova et al. 2007; Hornitschek et al. 2009).

Según nuestros resultados, HFR1 no parece regular la expresión de *PSY* o la síntesis de carotenoides (**Figura R1.3A**) (Bou-Torrent, Toledo-Ortiz & Ortiz-Alcaide 2015). Por el contrario PAR1 promueve la biosíntesis de carotenoides y directamente induce la expresión de *PSY* (**Figura R1.3**), formando heterodímeros no funcionales con proteínas PIFq como PIF1 (Bou-Torrent, Toledo-Ortiz & Ortiz-Alcaide 2015) (**Figura D.1**).

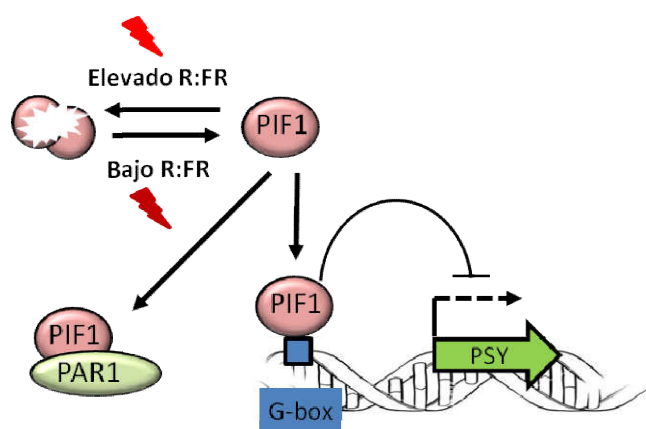


Figura D.1 Modelo propuesto para la regulación directa de la expresión del gen *PSY* mediante PIF1 y PAR1. PIF1 es inestable en luz W, que posee un ratio R/FR elevado. En cambio, en presencia de sombra (bajo ratio R/FR) es capaz de acumularse y unirse al promotor de *PSY* para reprimirlo. La sombra también induce la acumulación de PAR1, que es capaz de capturar a PIF1 y evitar que se una al promotor de *PSY*. De esta forma se implementa un mecanismo de “acelerador y freno” donde el equilibrio dinámico entre las concentraciones de estos dos factores decide la intensidad y el mantenimiento (o no) de procesos asociados a la respuesta a sombra, como la acumulación de carotenoides.

De forma similar, nuestros resultados sugieren que miembros de la subfamilia XII como BHLH78 y BHLH60 (cuya expresión también se induce por sombra) son capaces de formar heterodímeros con PAR1, compitiendo con PIFq en la regulación tanto de la elongación del hipocotilo como de la expresión de *PSY* (**Figuras R1.4 y R1.5**). La inducción rápida y transitoria de la expresión de *PAR1* que tiene lugar después de la exposición a sombra simulada puede actuar como un mecanismo de prevención de una excesiva reducción de la producción de carotenoides via la regulación de la expresión de *PSY*, haciendo posible que la planta pueda reaccionar de forma rápida en cuanto la señal de sombra desaparece. En el caso de que persista la sombra, la acumulación de carotenoides disminuye independientemente de la expresión de *PSY* (**Figura R1.1**).

Nuestros resultados sugieren que el módulo antagonista PIFq-HY5, previamente descrito como controlador de la expresión de *PSY* y la síntesis de carotenoides en respuesta a temperatura y luz (Toledo-Ortiz et al. 2014), no es relevante durante el SAS. Consistentemente, PAR1 y HY5 también actúan en rutas diferentes para inhibir la elongación del hipocotilo bajo diferentes condiciones lumínicas (Zhou et al. 2014). En su lugar, módulos específicos de miembros de la familia bHLH parecen controlar diferentes sets de respuestas asociadas al SAS. Así, PIF7 y HFR1 están implicados en la regulación de la elongación del hipocotilo en presencia de sombra (Sessa et al. 2005; Li et al. 2012) pero no tienen un rol en la regulación de la biosíntesis de carotenoides, mientras que PIFq y PAR1 regulan ambas respuestas (**Figura D.2**). Por otro lado, los componentes individuales de estos módulos de regulación no siempre regulan la biosíntesis de carotenoides en otros estadios de desarrollo o diferentes estímulos. En el caso del módulo PIFq-PAR1, por ejemplo, PAR1 no parece controlar la producción de carotenoides en semillas etioladas (Bou-Torrent, Toledo-Ortiz & Ortiz-Alcaide 2015), mientras que la acumulación de transcrito de *PSY* que tiene lugar en las raíces de *Arabidopsis* expuestas a estrés salino, no parece requerir la actividad de las proteínas PIFq (Ruiz-Sola et al. 2014). La falta de correlación entre la regulación de la elongación del hipocotilo en presencia de sombra y la iniciación de la floración (otra respuesta del SAS) en más de 100 ecotipos de *Arabidopsis* (Botto & Smith 2002), sirvió de previo apoyo a la conclusión de que diferentes vías de señalización controlan distintas respuestas a sombra (Martínez-García et al. 2010). Sin embargo, los resultados presentados aquí, van un paso más allá mostrando la coexistencia entre diferentes vías de señalización controlando diferentes respuestas (elongación del hipocotilo o acumulación de carotenoides) en el mismo estadio de desarrollo.

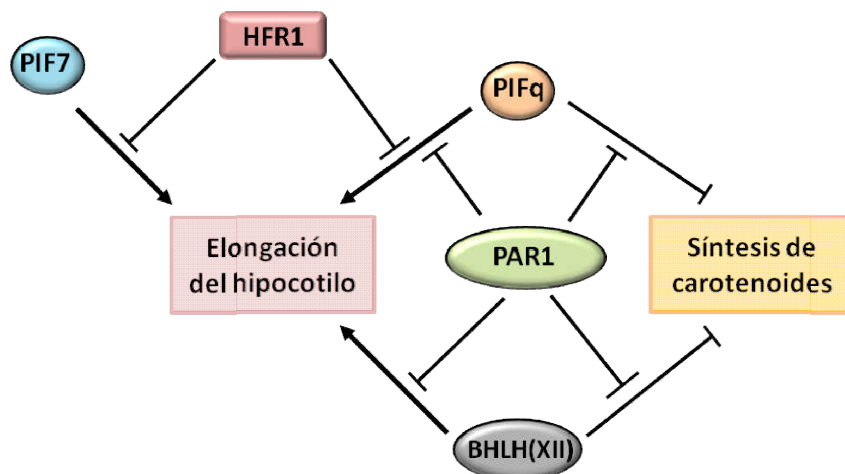


Figura D.2 Un modelo de módulos antagonistas para regular dos respuestas del SAS: elongación del hipocotilo y biosíntesis de carotenoides.

El tratamiento de sombra aumenta rápidamente la actividad de las proteínas PIFq y PIF7 y la expresión de genes que codifican proteínas de la familia bHLH como HFR1, PAR1, y varios miembros de la subfamilia XII. Los módulos de activación y represión formados por estos factores inducen después la expresión de genes necesarios para la elongación y reprimen genes implicados en la acumulación de carotenoides (incluyendo PSY).

También hemos mostrado que, además de con las proteínas PIFq, PAR1 puede formar módulos reguladores con otras bHLHs represoras de la expresión de *PSY* y la biosíntesis de carotenoides. El hallazgo de estos nuevos represores de la carotenogénesis, así como los trabajos futuros encargados de profundizar en el mecanismo de regulación de la biosíntesis de carotenoides bajo diferentes condiciones ambientales, servirá para comprender mejor cómo las plantas controlan la producción de estos metabolitos esenciales y para manipular los perfiles de carotenoides de determinados tejidos en respuesta a tratamientos específicos, mejorando así el valor nutricional o industrial de plantas de interés.

2. Los carotenoides generan señales retrógradas que reprimen la respuesta a sombra

El SAS es una respuesta adaptativa que determina la supervivencia de la planta en ambientes con elevada densidad vegetal, tal y como ocurre bajo un dosel arbóreo o en cultivos de alta concentración. Sin embargo, se desconoce si el estado metabólico de los cloroplastos (incluyendo los niveles de carotenoides) modula la respuesta a sombra. En este capítulo discutiremos la importancia de mantener niveles adecuados de carotenoides (y en concreto de sus derivados oxidativos) para una correcta regulación de la respuesta a sombra estimada como la elongación del hipocotilo en plantas expuestas a W+FR.

2.1 La respuesta a sombra requiere de cloroplastos fotosintéticamente activos

La aplicación de diferentes inhibidores que interfieren con el desarrollo y la actividad fotosintética de los cloroplastos y que tienen como diana diferentes procesos como la síntesis de proteínas codificadas por el plastoma (LIN, CAP) o la síntesis de isoprenoides plastídicos en general (FSM, CLM) o carotenoides en particular (NFZ, CPTA) reprime la respuesta a sombra a nivel del alargamiento del hipocotilo (**Figura R2.3, R2.14**). A nivel molecular, también se observa una respuesta alterada en función del marcador utilizado, tanto en tratamientos de corta como de larga exposición a sombra. Así podemos observar dos perfiles en cuanto a la expresión de genes que responden a sombra: o bien una represión de la respuesta (*HFR1*, *YUC8*, *PSY* o *PAR1*), o bien un desfase en la inducción de la respuesta (*PIL1*) (**Figuras R2.4 y R2.5**). También observamos el mismo efecto en la respuesta del hipocotilo de mutantes específicos de la vía del MEP (*dxs-1*, *hdr-1*) y de la ruta de síntesis de carotenoides (*psy-1*), que muestran un fenotipo albino y una represión de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra (**Figura R2.6**). Estos resultados indican que el mantenimiento de las funciones fotosintéticas en los cloroplastos es fundamental para una respuesta normal a sombra.

Múltiples estudios han desvelado que tanto en presencia de LIN como de NFZ, el cloroplasto es capaz de generar una batería de señales retrógradas que inducen una inhibición de genes necesarios para la fotosíntesis (PhANGs) en plantas WT (Larkin & Ruckle 2008; Ruckle et al. 2007). Y cada vez hay más ejemplos de cómo estas señales retrógradas son capaces de converger con rutas de señalización lumínica (Ruckle et al. 2007; Larkin & Ruckle 2008; Ruckle & Larkin 2009; Martín et al. 2016; Petrillo et al. 2014). Un estudio reciente (Martín et al. 2016) mostró que plantas tratadas con LIN o NFZ son incapaces de completar una correcta desetiolación. El mecanismo implicado depende de PIFs, que actúan como antagonistas de una señal retrógrada que induce a GLK1, un factor de transcripción implicado en la fotomorfogénesis (Martín et al. 2016). También se ha estudiado la importancia de los cloroplastos para regular la adaptación de la planta a la transición lumínica entre luz y oscuridad (Petrillo et al. 2014). Mediante la utilización de inhibidores de la cadena electrónica del cloroplasto, determinaron que el *pool* de plastoquinonas (otro tipo de isoprenoides plastídicos, como los isoprenoides) modula mecanismos de *splicing* durante la transición luz/oscuridad. El paso de plantas de oscuridad a luz induce procesos de *splicing* alternativo y cambios en genes relacionados con el procesamiento del RNA, pero el estudio no muestra diferencias de *splicing* en presencia de diferentes calidades de luz como rojo y azul (Petrillo et al. 2014). Por otro lado, aunque *cry1* y *GUN1* son responsables mayoritarios de la represión de *Lhcb* cuando la biogénesis del cloroplasto está bloqueada en luz azul, la represión en luz blanca parece más compleja (Larkin &

Ruckle 2008). En el espectro de luz blanca hay una mayor cantidad de luz R pero convergen diferentes calidades lumínicas, cada una detectada por diferentes fotorreceptores. El estudio de mutantes *phyB* (impedidos en la percepción de R) y *phyA* (impedidos en la percepción de FR) ha permitido concluir que mientras que *phyA* se comporta como un regulador positivo de *LHCB* en plántulas tratadas con LIN cuando GUN1 es inactivo, *phyB* actúa como un regulador negativo de *LHCB* en fondo *gun1-1*. Esto parece indicar que el *phyB* contribuye a la represión de *LHCB* cuando la biogénesis del cloroplasto está bloqueada en luz enriquecida en R, pero aun se desconoce el mecanismo por el cual GUN1, *cry1* y *phyB* reprimen a *LHCB* (Larkin & Ruckle 2008).

2.2 Los cloroplastos disfuncionales modulan la percepción y la señalización de luz via fitocromos

Con tal de descartar la posibilidad de que la respuesta a sombra se encuentre comprometida por la ausencia de capacidad fotosintética en plantas albinas (ya sea en plantas WT crecidas en presencia de inhibidores o en mutantes), se realizaron varios experimentos (**Figuras R2.7 y R2.8**). Como resultado se pudo ver que tanto en presencia de hormonas como en presencia de oscuridad las plantas conservaban su capacidad de elongación. Este resultado resulta comparable al obtenido en (Martín et al. 2016), donde plantas tratadas con LIN y crecidas en oscuridad mantuvieron la capacidad de alargarse. En este caso se observa una sutil disminución en la elongación del hipocotilo en las plantas tratadas con LIN respecto a las sin tratar, pero no resulta significativa, tal y como sucede en nuestro caso en presencia de NFZ y oscuridad (**Figura R2.8**). Por lo tanto, nuestros datos junto con los disponibles en la bibliografía permiten concluir que inhibidores que inducen daño en el cloroplasto desde diferentes dianas, como es el caso de NFZ y LIN, reprimen la respuesta de elongación a sombra pero no la capacidad de alargarse en otras condiciones, como por ejemplo al crecer en oscuridad. Estos resultados tan similares entre inhibidores nos hacen pensar que se trata de una respuesta común en ambos casos y que esta respuesta depende exclusivamente de la presencia de cloroplastos disfuncionales. Habiendo descartado la posibilidad de hiposensibilidad a luz en plantas tratadas con inhibidores (**Figura R2.8**), podemos concluir que en presencia de cloroplastos disfuncionales se da una represión de la respuesta a sombra posiblemente causada por una alteración en el funcionamiento de las vías de percepción o/y la señalización mediada por fitocromos.

2.2.1 Los cloroplastos modulan la percepción de luz por los fitocromos

El *phyB* es el principal fotorreceptor responsable de regular la elongación del hipocotilo durante el SAS (Holmes & Smith 1977; Yanovsky, Casal & Whitelam 1995; Smith 2000).

En nuestro caso el phyB es también el responsable de reprimir la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra en presencia de cloroplastos disfuncionales, ya que cuando no está presente no existe represión de la respuesta a sombra en presencia de inhibidor (**Figura R2.2**). Por ello escogimos este fitocromo en particular y lo fusionamos a GFP para estudiar su localización y deducir a partir de ello si el tratamiento con NFZ o LIN provocaba cambios en la actividad de este fotorreceptor (**Figuras R2.10 y R2.11**). En concreto, estimamos la actividad de phyB-GFP mediante el seguimiento de la aparición o desaparición de corpúsculos nucleares o *photobodies* en los que se localizan los fitocromos fotoactivados (Yamaguchi et al. 1999; Chen & Chory 2011). Así en presencia de luz W, phyB-GFP se acumula mayoritariamente en estos corpúsculos, mientras que en presencia de sombra o tras irradiar con FR se produce una desaparición progresiva de estos corpúsculos. Nuestros resultados muestran que tanto en presencia de NFZ como de LIN los corpúsculos nucleares desaparecen más lentamente (**Figuras R2.10 y R2.11**). Sin embargo, se desconoce exactamente la función de estos corpúsculos. Desde su observación hace 18 años (Yamaguchi et al. 1999) se ha debatido si son necesarios para la actividad de los fitocromos, ya que plantas sobreexpresoras de la parte N-terminal del phyB fusionado a GFP (NBG), no presentan corpúsculos nucleares aun siendo hipersensibles a la luz (Matsushita et al. 2003). Sin embargo también existen estudios que correlacionan la aparición de corpúsculos nucleares con phyB-GFP y la represión de la elongación del hipocotilo (Chen et al. 2003). La mayor parte de mutantes de pérdida de función de phyB, producen corpúsculos nucleares anormalmente pequeños y presentan un hipocotilo más alargado que el WT (Kircher et al. 2002; Chen et al. 2003; Matsushita et al. 2003; Nito et al. 2013). Por otra parte, en los mutantes de ganancia de función de phyB, se observa que phyB-GFP se localiza en corpúsculos nucleares más grandes, mientras que las plantas son más cortas que en el WT (Ádám et al. 2011; Medzihradszky et al. 2013; Zhang et al. 2013a). En el caso más extremo, el fitocromo mutante phyB-Y276H (YHB), que es constitutivamente activo, se localiza en corpúsculos nucleares grandes independientemente de las condiciones lumínicas, pudiendo inhibir la elongación del hipocotilo aún en oscuridad (Su & Lagarias 2007). Además mediante la comparación de líneas NBG (que no forman corpúsculos nucleares) y líneas sobreexpresoras de la proteína completa phyB-GFP (que sí los forman) se ha determinado que la presencia de estos corpúsculos está asociada a una mayor represión del alargamiento del hipocotilo en oscuridad (Van Buskirk et al. 2014). Se ha sugerido que estos corpúsculos son necesarios para la degradación de los PIFs, y en concreto de PIF3 (Van Buskirk et al. 2014). La presencia de otros fotorreceptores además de phyB (como los criptocromos) y de proteínas relacionadas con su degradación (como COP1) en corpúsculos similares (Wang 2001; Zhu & Huq 2014) refuerzan la idea de que estas estructuras podrían funcionar como punto de degradación de los fitocromos y de los PIFs. Como conclusión, aunque la formación de corpúsculos nucleares no parece ser imprescindible para la inhibición de la elongación del hipocotilo, existe una correlación

entre la represión de la elongación y la presencia de *photobodies*. En nuestro caso, el mantenimiento de los corpúsculos nucleares durante más tiempo en plantas tratadas con NFZ o LIN (**Figura R2.10 y R2.11**) también se correlaciona con el fenotipo de inhibición del alargamiento del hipocotilo con ambos tratamientos (**Figura R2.3**) y con la alteración en el comportamiento de los genes de respuesta rápida asociada a los fitocromos (**Figura R2.4**). Este resultado pone en relieve que los cloroplastos son capaces de modular directamente la capacidad del fitocromo para percibir la luz y traducir la señal para regular la expresión génica y la respuesta fisiológica a sombra.

Hasta ahora se había reportado que los fitocromos corregulan junto a las señales retrógradas la expresión de PhANGs (Martín et al. 2016; Ruckle et al. 2007; Larkin & Ruckle 2008), pero aún no se sabía que el estado del cloroplasto puede afectar directamente al comportamiento de los fitocromos. Sin embargo, no resulta tan extraño, ya que el metabolismo del cloroplasto y la funcionalidad de los fitocromos se encuentran estrechamente relacionados. Se sabe que son necesarios cloroplastos totalmente funcionales para que se exprese el gen codificante para HEMA1, la enzima limitante de la síntesis de tetrapirroles y por tanto de los cromóforos de los fitocromos (McCormac & Terry 2004). Concretamente, en presencia de LIN se inhibe la síntesis de proteínas del plasto y por tanto de 5-aminolevulinic acid (ALA), precursor de tetrapirroles, que resulta crítico para el desarrollo de la planta (**Figura I.6**). En presencia de NFZ, se da una inhibición de la acumulación de hemo, que es el precursor de la fitocromobilina, el cromóforo de los fitocromos (McCormac & Terry 2004). Por lo tanto, la propia actividad de percepción de luz de los mismos fitocromos se encuentra corregulada con el estado del cloroplasto vía la síntesis del cromóforo, y tal vez por ello la regulación de su degradación en los corpúsculos nucleares se ve afectada.

2.2.2 Los cloroplastos modulan las vías de transducción de la señal de sombra vía HY5

Según nuestros resultados, en presencia de cloroplastos disfuncionales y por tanto en presencia de señales retrógradas, HY5 es capaz de reprimir totalmente la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra. Sin embargo, esta represión solo se observa en plantas tratadas con NFZ o con otro inhibidor de la síntesis de carotenoides (**Figura R2.14, R2.15**). Además, la ausencia de HY5 restaura la expresión de genes de respuesta rápida asociada a fitocromos, en concreto *HFR1*, en presencia tanto de NFZ como de LIN (**Figura R2.28**). Por tanto, el resultado observado a nivel fenotípico (alargamiento del hipocotilo, específico de NFZ) podría ser debido a un factor que actúa independientemente de la expresión de genes regulados por HY5. Así en presencia de cloroplastos disfuncionales de forma paralela se dan cambios tanto a nivel de actividad de fitocromos como aguas abajo de su señalización. Y a nivel de transducción lumínica HY5 es uno de los protagonistas.

2.2.2.1 HY5 y señales GUN

HY5 se ha reportado en diferentes trabajos como diana de diversas señales retrógradas (Kindgren et al. 2012b; Ruckle et al. 2007; Larkin & Ruckle 2008). Por un lado, HY5 interviene en la integración de la señalización de los fitocromos con las señales retrógradas en el caso de plantas tratadas con LIN y luz azul (Larkin & Ruckle 2008; Ruckle et al. 2007). Concretamente, el mutante *hy5-2* se comporta como un mutante *gun* en presencia de luz azul y LIN y muestra expresión de genes fotosintéticos (*LHCB* y *RBCS*), indicando que HY5 es responsable de la represión de estos en plantas WT (Ruckle et al. 2007). Sin embargo, HY5 actúa como activador de estos mismos genes (vía *cry1*) en presencia de cloroplastos funcionales. Se ha propuesto que cuando los cloroplastos se estresan son capaces de generar una señal dependiente de GUN1 que reprime la expresión de estos genes vía ABI4 y a la vez se genera una señal plastídica desconocida que hace cambiar la actividad de HY5, transformándolo en un regulador negativo de la expresión de los genes *LHCB* y *RBCS* (Larkin & Ruckle 2008; Ruckle et al. 2007). Según nuestros resultados, GUN1 parece que no está implicado en esta señal de forma directa pues el mutante simple *gun1-101* no presenta elongación en presencia de NFZ ni de LIN y el doble mutante *hy5-51 gun1-101* se comporta de una forma muy similar a *hy5-51*, aunque con una menor capacidad de respuesta en presencia de NFZ (**Figura R2.24A**).

Por otra parte, se ha determinado que HY5 actúa junto con la chaperona HEAT SHOCK PROTEIN (HSP90) en la regulación de *LHCB* por señalización dependiente de Mg-ProtoIX (Kindgren et al. 2012b). En concreto se propone que en presencia de NFZ el cloroplasto exporta Mg-ProtoIX al citoplasma vía GUN5. En el citosol, inhibe la actividad de HSP90, que a su vez reprime la expresión de *LHCB* mediante el control de la actividad de HY5 (Kindgren et al. 2012b). Según nuestros resultados, el mutante *gun5-1* responde como el WT en presencia tanto de NFZ como de LIN. En cambio el doble mutante *hy5-2 gun5-1* presenta un fenotipo de represión más acusado que el mutante *hy5-2* en presencia de NFZ (**Figura R2.24B**). Esto sugiere que la respuesta represora de HY5 podría estar mediada en parte vía GUN5.

El hecho de observar un ligero fenotipo de represión en el doble mutante *hy5-51 gun1-101* en presencia de NFZ puede ser debido a que en parte GUN1 puede afectar a la señalización dependiente de Mg-Proto-IX, aunque aún se desconoce si ejerce una participación directa (Larkin 2016). Mediante microarrays de *gun5* y *gun1*, se observó que expresan sets similares de genes en presencia de NFZ, indicando una posible implicación de GUN1 en el metabolismo de Mg-Proto-IX (Woodson & Chory 2008). Por una parte parece que GUN1 actúa aguas abajo de la señal según evidencias genéticas (Koussevitzky et al. 2007) aunque otros estudios postulan que ejerce también un rol aguas arriba impidiendo la síntesis de ALA, el precursor de los tetrapirroles (Terry & Smith 2013). Otros estudios han sugerido la posibilidad que el hemo interaccione con

una señal dependiente de GUN1 para afectar un factor de transcripción PHD con dominio transmembrana (PTM) que actúa aguas abajo de GUN1 (Larkin 2016). En cualquier caso, aunque evidencias genéticas sugieren que GUN1 está relacionado con múltiples señales retrógradas relacionadas con el estado redox, con PGE o la biosíntesis de tetrapirroles, el mecanismo de cómo GUN1 integra estas señales aun se desconoce (Kleine et al. 2013). GUN1 es una proteína PPR implicada en el metabolismo del ARN y por tanto su capacidad de integración de diferentes señales podría deberse a una promiscuidad de dianas de ARN. También parece ser muy promiscuo en cuanto a la interacción con otras proteínas presentes en el cloroplasto (Tadini et al. 2016; Colombo et al. 2016). Por ello se hace difícil la interpretación de las señales específicas derivadas de GUN1. Debido a que observamos una inhibición más evidente de la respuesta en presencia de NFZ en el mutante *hy5-2 gun5-1* y el mutante *gun5* es mucho más específico que *gun1*, parece más plausible que la señal dependiente de Mg-Proto-IX esté involucrada en la activación de HY5. De esta forma HY5 ejercería un mayor poder represor en presencia de cloroplastos disfuncionales.

2.2.2.2 Nuevo rol de HY5 como represor del SAS

Según nuestros resultados HY5 reprime la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra, aun en presencia de cloroplastos funcionales, y además esta represión es dependiente de la dosis de HY5 (**Figura R2.13**). Estudios anteriores han determinado que HY5 es capaz de inhibir la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra mediante su acumulación tras exponer a plantas crecidas en sombra a destellos de luz (Sellaro et al. 2011; Casal 2013). Sin embargo, su participación directa en la regulación de la elongación del hipocotilo durante el SAS y su mecanismo de represión no han sido explorados. En esta tesis se ha estudiado si se producían cambios en los niveles de HY5 al someter a las plantas a condiciones de sombra simulada (W+FR) a diferentes niveles: transcritos, proteína, y actividad, es decir, afinidad por promotores de genes diana implicados en la elongación del hipocotilo (**Figuras R2.25, R2.27 y R2.29**). Los niveles de transcritos de HY5 no cambian excesivamente en presencia o ausencia de sombra, aunque sí que se observa una ligera inducción (**Figura R2.25**). En contraste, la expresión de HY5 se induce claramente al bloquear la función de los cloroplastos con NFZ o LIN. Esto parece indicar que existen señales retrógradas que inducen la transcripción de HY5 y que resultan comunes a varios inhibidores (**Figura R2.25C**). En cuanto a la proteína, se sabe que el control de la estabilidad de HY5 vía COP1 durante el proceso de desetiolación es clave para la transducción de la señal de luz, sin embargo se desconoce su regulación en condiciones de sombra en plántulas totalmente desetioladas como en nuestro caso. En estas condiciones, aunque COP1 parece tener un rol en la regulación del SAS (Pacín et al. 2013), parece no regular la estabilidad de HY5 (Rolaufts et al. 2012). Nuestros resultados indican que tal y como ocurre a nivel de transcrito los niveles de proteína HY5 son mayores en las plantas tratadas con NFZ y LIN comparadas con los detectados en plantas verdes, sin tratar

(Figura R2.27). Además, se confirma que el tratamiento de sombra causa una pequeña inducción en la cantidad de HY5 en plantas verdes, lo que resulta contrario a lo que esperábamos ya que HY5 actúa como un represor de la elongación del hipocotilo. También los experimentos de ChIP detectaron que el tratamiento con sombra o con NFZ provoca una mayor unión de HY5 en los promotores de genes relacionados con la represión de la elongación del hipocotilo (Figura R2.29). Este resultado se corresponde con la bibliografía, donde se observa que HY5 es capaz de unirse de forma diferencial a los promotores de *CHALCONE SYNTHASE (CHS)* y *RIBULOSE BIPHOSPHATE CARBOXILASE SMALL SUBUNIT (RbcS1A)* en función de la presencia de luz FR, R o azul (Lee & He 2007). Estos resultados sugieren que en plantas con cloroplastos funcionales, la exposición a sombra provoca una acumulación (aunque ligera) de HY5 activo (es decir, capaz de unirse a sus promotores diana de genes que reprimen la elongación). Esto se puede entender en el contexto de los mecanismos de “aceleración y freno” comentados anteriormente como fundamentales en la regulación de la respuesta a sombra. Además de HY5, el tratamiento con W+FR provoca la acumulación o activación de otros factores que, al contrario de HY5, inducen la elongación del hipocotilo (como los PIFs; ver siguiente párrafo). Si la sombra persiste, estos otros antagonistas de HY5 acaban predominando e induciendo la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra. En cambio en presencia de NFZ, los niveles de HY5 se acumulan a niveles aun mayores y se consigue reprimir la elongación, a lo que seguramente contribuye que los antagonistas de HY5 no actúan de forma tan activa. Por otro lado, se sabe que la unión de HY5 en los promotores diana no tiene por qué inducir su transcripción, sino que su transcripción se corregula por la presencia de otros elementos *cis* en los promotores regulados por luz. Un ejemplo es la regulación de la transcripción de *CHS* y *RbcS1A*, donde si bien se inducen durante el día mediante HY5, también se ha determinado que HY5 se mantiene unido a estos promotores en oscuridad (Lee & He 2007).

Como se ha comentado anteriormente, los PIFs son unos buenos candidatos a posibles antagonistas de HY5 durante la respuesta a sombra. Si bien se determinó que en presencia de NFZ el mutante *pifq* se comporta igual que el WT (Figura R2.12), tendría sentido probar si diferentes líneas sobreexpresoras de PIFs son capaces de restaurar la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra cuando se bloquea la función de los cloroplastos con inhibidores. HY5 es capaz de actuar como antagonista de los PIFs en gran cantidad de respuestas (Leivar & Quail 2011; Kami et al. 2010; Lau & Deng 2010; Toledo-Ortiz et al. 2014; Shin et al. 2007). Dos ejemplos interesantes serían el modulo PIF1/PIF3 y HY5/HYH, que interaccionan físicamente para regular la expresión de genes implicados en la respuesta a ROS en presencia de elevada intensidad lumínica (Dongqin Chen et al. 2013). En nuestro caso, y debido a que la administración de NFZ y LIN produce un efecto fotooxidativo podría ocurrir que PIF1 o PIF3 estén mediando la respuesta a estrés. Además, según nuestros resultados, vemos un incremento

significativo en la elongación del hipocotilo en presencia de NFZ en el mutante *hyh* (**Figura R2.12**). Por lo tanto, esto podría indicar una posible sinergia en la represión del hipocotilo entre el mutante *hyh* y *hy5-2*. Otro ejemplo interesante es el módulo HY5-PIF4. Mediante ChIP se determinó que HY5 es capaz de unirse a PIF4 (Lee & He 2007) y se ha propuesto posteriormente como un módulo para la regulación de la elongación del hipocotilo por temperatura (Johansson et al. 2014). PIF4 junto a PIF5 serían unos buenos candidatos para antagonizar a HY5 en la respuesta a sombra. Por una parte, se ha determinado que a altas temperaturas promueven la transcripción de genes que controlan la biosíntesis de auxinas (Johansson et al. 2014), entre ellos *YUC8* (Sun et al. 2012), cuya transcripción también la vemos reprimida en presencia de NFZ y LIN (**Figura R2.4**). Y por otro lado, tanto PIF4 como PIF5 controlan la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra (Leivar et al. 2012b).

2.2.3 Derivados de carotenoides reprimen la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra

Mediante la comparación del perfil de pigmentos entre plantas tratadas con NFZ, FSM o LIN confirmamos que en presencia de inhibidores de carotenoides (NFZ) se bloquea la producción de carotenoides por debajo de fitoeno de forma específica, mientras que el tratamiento con inhibidores de isoprenoides (FSM) o inhibidores del plastoma (LIN) hacen disminuir los niveles de carotenoides de forma drástica pero no total (**Figura R2.15**). Esto también sucede en el caso de los mutantes *dxs-1* (con un bloqueo de la ruta del MEP) y *psy-1* (con un bloqueo en la síntesis de carotenoides). Resultados generados en nuestro laboratorio mostraron que *dxs-1* acumula mayores niveles de carotenoides que *psy-1*, siendo casi indetectables en este último (Águila Ruiz-Sola et al. 2016). Aunque la FSM es un inhibidor de la vía del MEP y por tanto de la síntesis de los precursores de los carotenoides, observamos que las plantas tratadas con este inhibidor mantienen niveles detectables de β -caroteno, neoxantina, violaxantina y luteína, de forma similar a lo observado con LIN (**Figura R2.15**). La presencia de carotenoides en plantas *dxs-1* o WT crecidas en FSM y no en plantas *psy-1* o WT crecidas en NFZ puede ser debida al intercambio de DMAPP y IPP entre el citosol (generados por la vía del MVA) y los plastos, que podría ser suficiente para que se puedan producir niveles bajos de carotenoides (Dudareva et al. 2005). La restauración de la respuesta a sombra del mutante *hy5-2* en presencia de NFZ+FSM, NFZ+CLM y NFZ+LIN (**Figura R2.14**) confirmó que para observar el efecto desrepresor de la pérdida de función HY5 sobre el alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra es necesaria la ausencia total de carotenoides.

2.2.3.1 ABA como señal retrógrada

El ABA es un apocarotenoide sintetizado tanto a partir de zeaxantina, neoxantina y violaxantina en algas y plantas. Esta molécula señal se caracteriza por su gran variedad de roles en el desarrollo y fisiología vegetal, participando además en la adaptación al medio por parte de la planta: dormancia de las semillas y los brotes, control de la germinación y de la división celular, síntesis de proteínas de reserva en semillas, respuesta a estrés osmótico (sal, sequía), o defensa contra el ataque de insectos, entre otros (Escalante-Pérez et al. 2011). Mediante la administración de diferentes concentraciones de ABA a plantas WT y mutantes *hy5-2* determinamos que el ABA también reprime la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra (**Figura R2.21 y R2.22**). Existen varios indicios de la participación del ABA en el SAS. Aunque aun no se ha descrito un papel del ABA en la respuesta a sombra como represor de la elongación del hipocotilo, sí se le ha implicado en la inhibición de la ramificación (Reddy et al. 2013). La exposición de hojas de plantas de tomate a W+FR genera un incremento de ABA (Cagnola et al. 2012). Por último, un estudio de RNAseq reciente de plantas tratadas durante 3 días en luz blanca y 4 días en W+FR, determinó la presencia de un enriquecimiento genes relacionados con la respuesta a ABA en plantas de *Arabidopsis* crecidas durante 3 días en W y 4 días en W+FR (Nozue et al. 2015). Además, nuestros resultados muestran que la represión por ABA es independiente de la represión ejercida por HY5 ya que tanto las plantas WT como *hy5-2* presentan susceptibilidad al tratamiento con ABA (**Figura R2.21**). Este resultado lo confirmamos genéticamente mediante la caracterización de la respuesta a sombra en términos de elongación del hipocotilo del mutante *aba2*, que tiene impedida la síntesis de ABA (Ruiz-Sola et al. 2014). De manera interesante este mutante mantiene una cantidad comparable de clorofilas y carotenoides respecto a las plantas WT (**Figura R2.22**), indicando que la represión de la producción de ABA es muy específica y no afecta al perfil global de pigmentos. El mutante *aba2* presenta una mayor respuesta al WT y además el doble mutante *hy5-2 aba2* presenta una respuesta aditiva respecto al mutante simple *hy5-2*, confirmando que el ABA actúa de forma independiente a HY5. En otros sistemas, se ha descrito que HY5 actúa como integrador de la señal de luz y la respuesta a ABA durante la germinación de la semilla y el desarrollo de la planta mediante la regulación de *ABI5*, cuya sobreexpresión confiere sensibilidad a ABA en fondo *hy5-2* e inhibe la elongación del hipocotilo (Chen et al. 2008). Por otra parte, la aplicación farmacológica de ABA en el medio de cultivo de plantas WT y *hy5-2* en presencia o ausencia de NFZ (**Figura R2.21**) también mostró que el ABA reprime la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra de forma independiente a HY5. La ganancia de la capacidad de respuesta a sombra del mutante *hy5-2 aba2* en presencia de LIN (**Figura R2.22**) indica que la no respuesta del mutante *hy5* en presencia de este inhibidor es debida exclusivamente a la ausencia de ABA. Por tanto el ABA está implicado en la represión de la respuesta de elongación del hipocotilo en sombra junto con HY5 en presencia de inhibidores que no reprimen exclusivamente carotenoides (FSM, CLM, LIN o CAP). Este

resultado se corresponde con hecho de observar la fuerte represión de la respuesta aun con bajas concentraciones de inhibidor (**Figura R2.3**).

En presencia de cloroplastos disfuncionales por elevadas intensidades lumínicas, se produce ABA como una señal retrógrada que interviene en la respuesta de genes nucleares asociados al estado redox del plástido (PRANGs) (Bräutigam et al. 2007). Mediante el análisis de la expresión de genes en respuesta a un tratamiento de 28h de alta intensidad lumínica, se observó que el 81% de los genes diferencialmente expresados son dependientes del estado del PET. Dentro de este grupo de genes el 68% también están implicados en la respuesta a ABA, indicando su importante papel en la mediación de las respuestas de fotoprotección junto con el estado redox del cloroplasto (Bechtold et al. 2008). Este es el caso del gen *APX2*, que está relacionado con la producción de ROS en el tejido vascular, donde el ABA se encarga de propagar la señal de expresión del gen a la envoltura vascular (Galvez-Valdivieso et al. 2009). En nuestro caso, durante el tratamiento con NFZ se induce la síntesis de ROS. Ello es debido a que se inhibe la síntesis de carotenoides, reduciendo la capacidad de los plástidos para capturar especies ROS producidas en presencia de elevadas intensidades lumínicas y para sintetizar los precursores del ABA. Los estados redox de PET y PQ son capaces de regular la expresión de varios genes de la ruta de síntesis de carotenoides, incluyendo algunos correspondientes a la producción de precursores del ABA (Dietz 2015). Por lo tanto, existe un solapamiento significativo entre la regulación del PET y la síntesis de ABA. Por otra parte, el ABA está relacionado con señales retrógradas tipo GUN. La subunidad H de la enzima quelatasa de magnesio (CHLH/GUN5), que media la señal dependiente de Mg-Proto-IX e induce la activación de HY5 para reprimir los PhANGs (Kindgren et al. 2012b), afecta positivamente la señalización del ABA en el control de obertura de estomas, aunque se ha descartado su papel como receptor de ABA (Shen et al. 2006; Tsuzuki et al. 2011). Por otra parte, la regulación de la expresión de PhANGs se encuentra regulada por ABI4 vía GUN1 (Ruckle et al. 2007; Larkin & Ruckle 2008). También la represión de la elongación del hipocotilo parecen estar coregulada por HY5 junto con GUN1 mediante vías independientes, donde HY5 integraría la información lumínica a la vía GUN1 que es independiente de luz (Ruckle & Larkin 2009). Todos estos datos sugieren la posibilidad que ABA y HY5 estén estrechamente relacionados, aunque finalmente repriman la respuesta de manera independiente.

2.2.3.2 Otros derivados de carotenoides

Además del ABA, existen otros apocarotenoides capaces de actuar como señales retrógradas (Hou & Rivers 2016). Uno de ellos es el β -ciclocitral (Ramel et al. 2012). Aunque la oxidación del β -caroteno para generar β -ciclocitral puede tener lugar mediante catálisis enzimática por CCD1, CCD4, CCD7 y CCD8 (Hou & Rivers 2016), lo más habitual es que se genere mediante reacciones no enzimáticas. Por ejemplo, la

rotura oxidativa del β -caroteno debido a la presencia de $^1\text{O}_2$ en el PSII generado por elevadas intensidades lumínicas genera β -ciclocitral y β -ionona (Havaux 2014), que se acumulan en *Arabidopsis* en tan solo unos minutos después de un tratamiento de alta intensidad lumínica (Ramel et al. 2012). Debido a su naturaleza volátil, el β -ciclocitral puede difundirse hacia el exterior de la planta y actuar como señal entre planta y depredador, como ocurre en cianobacterias *Mycrocistis* que son capaces de generar este compuesto y alterar el comportamiento del depredador *Daphnia magna*, para evitar ser comidas por éste (Jüttner et al. 2010). O difundirse desde el cloroplasto hacia otros compartimientos celulares, actuando como señal retrógrada (Ramel et al. 2012). La exposición de plantas a concentraciones fisiológicas elevadas de β -ciclocitral inducen la expresión de genes relacionados con el incremento de la tolerancia a estrés oxidativo (Ramel et al. 2012). En concreto en presencia de este compuesto se inducen genes de respuesta a estrés (sobre todo a $^1\text{O}_2$) y se reprimen genes relacionados con H_2O_2 , aunque el impacto en estos últimos no es tan claro (Ramel et al. 2012).

Cuando administramos exógenamente β -ciclocitral a plantas verdes (crecidas sin inhibidores), observamos que a bajas concentraciones reprime fuertemente la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra, mientras que en altas concentraciones llega a inhibir la germinación (**Figura R2.20**). Esto se correlaciona con que las plantas expuestas a concentraciones fisiológicas de este compuesto también reducen la expresión de genes relacionados con el desarrollo y crecimiento (Ramel et al. 2012). La represión de la respuesta de elongación mediada por β -ciclocitral sucede de forma independiente a HY5 ya que el mutante también responde a este apocarotenoide y deja de elongarse en respuesta a sombra en presencia de NFZ (**Figura R2.20C**). Nuestros resultados también sugieren que la represión de la respuesta de alargamiento por parte de β -ciclocitral es independiente de ABA (**Figura R2.23**). Aún así estas vías parecen estar comunicadas entre sí ya que la adición exógena de β -ciclocitral induce una mayor acumulación de β -caroteno, el precursor del β -ciclocitral y del ABA (**Figura R2.23A**). Además, la adición de β -ciclocitral genera la inducción de genes que también se inducen en presencia de ABA (Ramel et al. 2012). En concreto están relacionados con la respuesta a ABA genes de respuesta a $^1\text{O}_2$ como *GLUTATHIONE TRANSFERASE 12* (At1g10370), *MAPKKK18* (At1g05100), *LOW TEMPERATURE-INDUCED 30* (At3g50970) o genes de respuesta a H_2O_2 como *CYSTEINE-RICH RECEPTOR LIKE PROTEIN KINASE 21* (At4g23290) o *BEACH-DOMAIN HOMOLOGUE* (At1g03060) (Zalejski et al. 2006; Mitula et al. 2015; Sánchez et al. 2004; Kline et al. 2010). Esto indica que seguramente ambas rutas convergen en la regulación del estrés oxidativo aunque actúan de forma independiente en la represión de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra.

Según nuestros resultados, para la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra es necesario un intercambio de gases, ya que las plantas crecidas en placas selladas dejan

de alargarse en respuesta a sombra aun en ausencia de β -ciclocitral (**Figura R2.20B**). En ausencia de intercambio de gases, las plantas pueden inducir respuestas de estrés que podrían incluir la formación de productos de oxidación de carotenoides volátiles como es el caso del β -ciclocitral. Las plantas verdes son ricas en precursores de apocarotenoides, por ejemplo en β -caroteno, y por tanto en un ambiente hermético pueden producir y acumular una gran cantidad de β -ciclocitral, reprimiendo de esta manera la respuesta a sombra. En presencia de NFZ (**Figura R2.20 C**) y FSM (**Figura R2.23B**), las plantas *hy5-2* conservan la capacidad de respuesta aun sellando las placas. Esto puede ser debido a que tanto en NFZ como en FSM la producción de β -ciclocitral debe ser o nula (NFZ) o mucho menor (FSM) que en plantas verdes a juzgar por los niveles de su precursor (β -caroteno) presente en las mismas (**Figura R2.15**). De la misma manera, la adición extra de β -ciclocitral al medio con FSM tiene un efecto mucho menor al observado en el medio con NFZ, seguramente porque en medio con FSM ya se produce algo de β -ciclocitral endógenamente.

Aunque el tratamiento con β -ionona solo produce la inducción de un único gen relacionado con la respuesta a $^1\text{O}_2$, su derivado DHA induce la expresión de genes correlacionados con un incremento en la tolerancia al estrés fotooxidativo (Ramel et al. 2012; Shumbe et al. 2014). Por tanto, es posible que otro apocarotenoide volátil como la DHA pueda tener un papel en la regulación de la respuesta a sombra junto al β -ciclocitral. En cuanto a otras hormonas volátiles que podrían estar también involucradas, el etileno es un buen candidato ya que se acumula en presencia de W+FR (Cagnola et al. 2012) y en ausencia de intercambio de gases (Voesenek & Sasidharan 2013). El etileno ejerce un doble rol en el control de las respuestas de alargamiento, ya que actúa como represor de la elongación del hipocotilo durante la desetiolación y como inductor de la elongación en plantas totalmente desetioladas y tratadas con sombra (Das et al. 2016). Por tanto, es difícil especular sobre su efecto en la respuesta a sombra en plántulas como es en nuestro caso, germinadas ya en ausencia de intercambio de gases. También sería difícil explicar, basándonos solamente en la producción de etileno, la restauración de la elongación en ausencia de carotenoides del mutante *hy5-2*.

2.3 Un modelo integrador del papel de HY5, las señales retrógradas y los apocarotenoides en la regulación de la respuesta a sombra

Teniendo en consideración los resultados obtenidos y la literatura disponible, proponemos un modelo que integra distintos actores reguladores de la elongación del hipocotilo para explicar cómo las plantas responden a sombra en función del estado fisiológico de sus cloroplastos (**Figura D.3**).

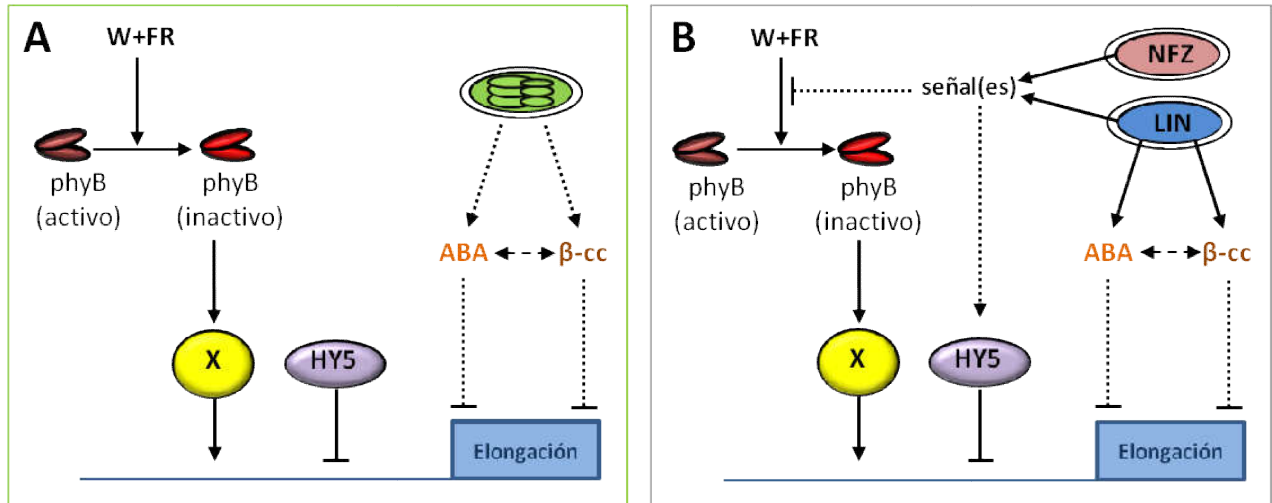


Figura D.3 Un modelo integrador del papel de HY5, las señales retrógradas y los apocarotenoides en la regulación de la respuesta a sombra.

A) En presencia de una señal de sombra (W+FR, bajo R/FR) se induce la elongación del hipocotilo en plantas WT con cloroplastos funcionales. La señal de sombra desactiva a phyB, lo que a su vez causa una acumulación de activadores de la elongación del hipocotilo representados en el modelo como X (como por ejemplo los PIFs). Si bien HY5 actúa como represor de la respuesta, X acabaría determinando la inducción de la elongación del hipocotilo. En estas condiciones normales de crecimiento, no se generan cantidades relevantes de apocarotenoides represores de la elongación del hipocotilo como el ABA o el β-ciclocitral. B) En plantas tratadas con inhibidores que afectan a la síntesis de carotenoides (NFZ) o la expresión del plastoma (LIN), la presencia de cloroplastos disfuncionales genera señales retrógradas que inhiben la desactivación del phyB por sombra y aumentan la acumulación de HY5. Además, en presencia de estrés, en el caso de LIN (pero no al tratar con NFZ) se da la síntesis de apocarotenoides como el ABA y el β-ciclocitral, ambos represores de la respuesta de elongación.

Durante este capítulo hemos demostrado la importancia de los cloroplastos para la respuesta a sombra. Así hemos observado que incluso pequeñas disrupciones del funcionamiento normal del cloroplasto (mediante el tratamiento con concentraciones bajas de inhibidores como NFZ o LIN) generan grandes cambios en la respuesta a sombra (**Figura R2.3**). Además también hemos determinado qué señales retrógradas producidas en plantas tratadas con inhibidores inhiben la desactivación por sombra de los fitocromos (**Figura R2.11**) y favorecen la acumulación de HY5 (**Figuras R2.25 y R2.27**), un represor de la respuesta de elongación (**Figura R2.13**). Por otro lado, señales retrógradas derivadas de carotenoides (apocarotenoides como el ABA y el β-ciclocitral) contribuyen para reprimir la respuesta a sombra (**Figuras R2.20 a R2.22**). En el caso de cloroplastos funcionales (**Figura D.3A**), el phyB en presencia de W+FR pasa mayoritariamente a su forma inactiva. Ello induce la activación de PIFs como PIF3, PIF4 y PIF5, que se unen a promotores de genes que inducen la elongación del hipocotilo (Leivar et al. 2012b). La exposición a sombra de plantas verdes también genera una mayor acumulación de proteína HY5 (**Figura R2.27**). La mayor estabilidad de HY5 en presencia de sombra podría deberse a cambios en su estado de fosforilación (Hardtke

et al. 2000). La caseína kinasa (CKII) se encarga de fosforilar HY5 en su dominio de unión con COP1 en oscuridad previniendo así su unión y por tanto evitando su degradación total (Hardtke et al. 2000). El estado fosforilado de HY5 presenta una mayor estabilidad, debido a que presenta una menor unión con COP1, pero a la vez hace que HY5 sea fisiológicamente menos activo, debido a que presenta menos afinidad a sus promotores (Hardtke et al. 2000). La fosforilación proporciona por tanto un nivel adicional de regulación de la actividad de HY5 independiente de su interacción con COP1. Un incremento en su estado de fosforilación explicaría los mayores niveles de proteína HY5 en sombra y, a la vez, el alargamiento del hipocotilo asociado a esta señal de luz, ya que la actividad de HY5 (es decir, su capacidad de regular la expresión génica) estaría disminuida. Sin embargo, experimentos de ChIP han mostrado que plantas verdes expuestas a W+FR presentan una mayor ocupación de promotores diana de HY5 para genes represores de la elongación del hipocotilo (**Figura R2.29**). No obstante, dado que HY5 se agrupa en multicomplejos junto con otros factores de transcripción y elementos *cis*, una mayor unión a promotores no implica una mayor transcripción de estos genes (Lee & He 2007).

En presencia de sombra HY5 se une más al promotor de *GUN5*. Estudios anteriores determinaron que HY5 es capaz de unirse al promotor de *GUN5* y regular positivamente su transcripción, compitiendo con los PIFs (Toledo-Ortiz et al. 2014). La pérdida de función PIF en el mutante *pifq* altera la expresión de *GUN5* pero también de otros genes relacionados con señal retrograda y la ruta de los tetrapirroles como *HEMA1*, *GUN4*, y *PORC* (Sentandreu et al. 2011). En concordancia con el rol de HY5 como inductor de la transcripción de *GUN5* (Toledo-Ortiz et al. 2014), la transcripción de *GUN5* también se encuentra reprimida por el cuarteto PIFq en oscuridad (Leivar et al. 2009; Zhang et al. 2013b; Toledo-Ortiz et al. 2014). Por otra parte, mutantes *pif3* tienen desregulada la biosíntesis de los genes relacionados con la síntesis de clorofilas como *HEMA1*, *GUN4*, y *GUN5*, induciendo una acumulación del intermediario PChlide y una hipersensibilidad a la fotooxidación (Zhong et al. 2014). De hecho, la regulación diferencial de *GUN5* en presencia de luz y oscuridad tiene sentido, ya que pertenece a la ruta de la biosíntesis de los precursores de la clorofila. Consistentemente con el rol inductor de *GUN5* en la síntesis de clorofilas en luz, el mutante *gun5* se caracteriza por tener una reducción dependiente de luz en la acumulación de clorofila (Mochizuki et al. 2001), lo que implica a su vez una mayor hipersensibilidad a la fotooxidación. Esta podría ser la razón por la que el mutante *gun5-1* presenta una represión de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra en comparación con el WT, en ausencia de inhibidores (**Figura R2.24B**). En conjunto, proponemos que el resultado de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra en las diferentes condiciones estudiadas se debe aun balance entre represores (HY5) e inductores (por ejemplo los PIFs).

Por otro lado, en presencia de inhibidores como NFZ o LIN (**Figura D.3B**) se inhibe la conversión del phyB a la forma inactiva en presencia de W+FR (**Figuras R2.10 y R2.11**). Sin embargo la actividad de este fitocromo no se ve afectada ni por la ausencia de HY5 ni por la presencia de ABA (**Figuras R2.31 y R2.32**). De estos resultados se puede deducir que el efecto represor de ambos componentes se da aguas abajo de la percepción de la luz por parte de los fitocromos. Tampoco observamos diferencias entre la tasa de desactivación de phyB al comparar los tratamientos de NFZ y LIN (**Figura R2.11**), lo que implica que la señal retrógrada involucrada en la represión no requiere la presencia de carotenoides sino que se produce de forma genérica en presencia de una disfuncionalidad del cloroplasto. Esta u otra señal retrógrada independiente de carotenoides también tendría un efecto positivo en la acumulación de HY5 (**Figuras R2.25 y R2.27**). Por otra parte, la presencia de LIN o NFZ haría cambiar los niveles o la actividad de los antagonistas de HY5, de forma que permitirían que HY5 mediara la represión de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra. Aunque la naturaleza de la señal o señales retrógradas responsables de estas respuestas no se conoce, es importante destacar que las vías de señalización retrógrada generadas en presencia de cloroplastos disfuncionales están comunicadas entre sí (**Figura I.6**). En particular, las vías dependientes de GUN1 y GUN5 se encuentran íntimamente relacionadas. Aunque el doble mutante *gun1 gun5* exhibe un fenotipo GUN aditivo en comparación con los mutantes simples (Mochizuki et al. 2001), GUN1 también comparte con GUN5 un rol en la regulación del metabolismo de Mg-Proto-IX aunque se desconoce si ejerce una participación directa (Larkin 2016). Aunque diversos estudios postulan que el tratamiento con LIN no parece activar la señalización dependiente de tetrapirroles (Koussevitzky et al. 2007), otros estudios concluyen que el uso de LIN también inhibe la síntesis de tetrapirroles debido a la inhibición de la transcripción del tRNA-Glu (Woodson et al. 2013). Además se sabe que lesiones la ARN polimerasa del plasto (PEP), y por tanto en la traducción de proteínas del plasto, causa cambios en los PhANGs en respuesta a elevada intensidad lumínica y además cambios en el estado redox del pool de plastoquinonas (Kindgren et al. 2012a). La presencia de NFZ y de LIN también induce estrés oxidativo debido a que las plantas carecen de pigmentos fotosintéticos, y por tanto es plausible que ambos inhibidores activen cascadas de señal retrógrada comunes que dependan de moléculas ROS. Esto sugiere que la inhibición de una vía implica la alteración del resto, con lo que resulta altamente difícil aislar completamente las vías. Con tal de determinar la identidad de la señal o señales retrógradas que reprimen la desactivación de phyB por sombra o inducen la acumulación de HY5, en el futuro serían necesarios análisis adicionales, como por ejemplo el estudio mediante RNAseq de la respuesta en nuestras condiciones experimentales en presencia de NFZ o LIN y sombra.

Por otra parte, el tratamiento con LIN (pero no el tratamiento con NFZ) genera derivados de carotenoides capaces de reprimir también la elongación del hipocotilo, lo

que contribuye a impedir el alargamiento de las plantas en respuesta a sombra. Gracias a la ausencia total de carotenoides mediante el tratamiento con NFZ, pudimos detectar el rol de HY5 en la represión de la respuesta. Solo en condiciones en las que los cloroplastos pierden su función pero no se producen apocarotenoides ni está presente HY5 se produce elongación en respuesta a sombra (**Figura R2.14**). Nuestros datos sugieren que el ABA y el β -ciclocitral estarían implicados en esta represión, actuando además de manera independiente a HY5. En un futuro cabría investigar si otros posibles apocarotenoides pueden actuar como reguladores negativos de la respuesta, que mecanismos de represión utilizan, y como se integran en el conjunto de señales retrógradas.

En conjunto, este trabajo ha demostrado que durante el SAS, los cloroplastos no solo tendrían un papel reactivo tras percibir cambios en la condiciones de luz sino también proactivo, participando en la señalización primaria por los fitocromos. La participación activa de los cloroplastos en el SAS podría dotar a las plantas de un mecanismo modulador para optimizar la respuesta a luz y el desarrollo vegetal según el estado metabólico de los cloroplastos, invirtiendo así los recursos energéticos adecuados para competir por la luz. Además, se ha demostrado que también los carotenoides ejercen un doble papel en la respuesta a sombra: sus niveles disminuyen para adaptar la fotosíntesis a las nuevas condiciones y a la vez sus derivados regulan la propia respuesta, un rol hasta ahora desconocido de los carotenoides.

Conclusiones

Conclusiones

1. Los miembros del cuarteto PIFq reprimen la biosíntesis de carotenoides en respuesta a sombra.
2. HY5 no está implicado en la regulación de la biosíntesis de carotenoides en respuesta a sombra.
3. PAR1 es un regulador positivo de la síntesis de carotenoides y de la expresión de *PSY*, en parte mediante su interacción con PIFq. PAR1 interacciona además con otras proteínas bHLH (BHLH78 y BHLH60) para regular la biosíntesis de carotenoides en respuesta a sombra.
4. Módulos distintos de activadores y represores regulan de forma independiente la biosíntesis de carotenoides y la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra.
5. La elongación del hipocotilo en respuesta a sombra requiere cloroplastos fotosintéticamente activos.
6. El estado fisiológico de los cloroplastos afecta a la actividad de los fitocromos. En respuesta a sombra, phyB se desactiva más lentamente en las plantas sin cloroplastos funcionales.
7. HY5 reprime la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra.
8. HY5 se acumula a niveles más altos en las plantas sin cloroplastos funcionales.
9. Derivados de carotenoides como ABA y β -ciclocitral reprimen la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra de forma independiente a HY5.
10. La respuesta a sombra implica una mayor acumulación de HY5 y una mayor unión a sus promotores diana. La sombra también induce la acumulación de activadores de la elongación del hipocotilo (como PIFq). La respuesta final depende de la proporción entre represores y activadores.

Materiales y métodos

Materiales y métodos

1. Material vegetal

En esta tesis doctoral se ha trabajado principalmente con plantas *Arabidopsis thaliana*, con los ecotipos Columbia 0 (Col-0) y Landsberg *erecta* (Ler). De manera puntual también se han empleado plantas de *Nicotiana benthamiana*.

1.1 Líneas de ganancia o pérdida de función.

En la tablas siguientes se presentan las líneas de pérdida y de ganancia de función empleadas a lo largo de la tesis doctoral:

Mutante	Ecotipo	Información relevante
<i>aba2</i>	Col-0	(Cheng et al. 2002)
<i>bHLH 60-1</i>	Col-0	SALK_002003
<i>bHLH 78-2</i>	Col-0	SALK_127100
<i>dxs-1</i>	Col-0	(Mandel et al. 1996; Phillips et al. 2008)
<i>gun1-101</i>	Col-0	Proporcionado por Dr.Robert M. Larkin (Ruckle et al. 2007)
<i>gun5-1</i>	Col-0	Proporcionado por Dr.Robert M. Larkin (Delker et al. 2014)
<i>hdr-1</i>	Col-0	(Hsieh & Goodman 2005)
<i>hds-3</i>	Col-0	(Gil et al. 2005)
<i>hy1-1 o gun2</i>	Ler-1	(Rodríguez-Concepción et al. 2004)
<i>hy5</i>	Col-0	Proporcionado por Dr.Robert M. Larkin (Ruckle et al. 2007)
<i>hy5 gun1-101</i>	Col-0	Proporcionado por Dr.Robert M. Larkin (Ruckle et al. 2007)
<i>hy5-2</i>	Col-0	(Bou-Torrent, Toledo-Ortiz & Ortiz-Alcaide 2015)
<i>hyh</i>	Col-0	N849765 (Delker et al. 2014)
<i>lut2-3</i>	Col-0	SALK_005018
<i>phyA-501</i>	Col-0	(Sokolova et al. 2012)
<i>phyB-9</i>	Col-0	Proporcionado por Dr. P.Quail
<i>pifq</i>	Col-0	(Leivar et al. 2008a)
<i>psy-1</i>	Col-0	(Pokhilko et al. 2015)

Tabla 1. Lista de mutantes de pérdida de función.

Línea transgénica	Descripción	Información relevante
35S:HA-HY5 [<i>hy5-Ks50</i>]	Línea sobreexpresora de HY5 unida a 2HA en N-terminal transformada en fondo mutante <i>hy5-Ks50</i>	(Lee & He 2007)
35S:HY5-GR [<i>hy5-2</i>]	Línea sobreexpresora inducible de HY5 en presencia de Dex. Fondo mutante <i>hy5-2</i>	Generada y transformada en el laboratorio
35S: HY5-GFP[<i>hy5-2</i>]	Sobreexpresión de HY5 unida a GFP en fondo <i>hy5-2</i>	Generada y transformada en el laboratorio
35S: <i>phyB-GFP</i>	Sobreexpresión de <i>PhyB-GFP</i> en fondo Col-0	Vector proporcionado por Dr. Akira Nagatani: pBI-Hyg-35S- <i>PhyB-GFP</i> transformado en el laboratorio en ecotipo Col-0
35S: <i>phyB-GFP</i> [<i>hy5-2</i>]	Sobreexpresión de <i>PhyB-GFP</i> en fondo <i>hy5-2</i>	Vector proporcionado por Dr. Akira Nagatani: pBI-Hyg-35S- <i>PhyB-GFP</i> transformado en el laboratorio en fondo mutante <i>hy5-2</i>
35S: <i>GFP-ΔN_HFR1</i>	Sobreexpresión de la Versión truncada de <i>HFR1</i>	(Galstyan et al. 2011)
35S: <i>PAR1-GFP</i>	Sobreexpresión <i>PAR-1</i>	(Roig-Villanova et al. 2007)

Tabla 2. Líneas transgénicas de ganancia de función.

1.2 Condiciones de crecimiento de plantas adultas

Las condiciones ambientales bajo las que se han crecido las plantas son las siguientes, Invernadero de Arabidopsis: 22±2 °C de temperatura, 14h de luz y 10h de oscuridad aproximadamente. Humedad ambiental del 55%.

Invernadero de tabaco: 25 °C y humedad ambiental del 60%.

Las características del sustrato y la solución de fertirrigación empleadas son las siguientes:

Sustrato nº 5: En una proporción 1:1:1 de tierra:perlita:vermiculita.

Solución de fertirrigación: Solución de Hoagli y Arnon (Hay et al 1938) modificada por Johnson et al 1957. KNO₃ 8.4 mM, NH₄NO₃ 1.2 mM, K₂HPO₄ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, Ca (NO₃)₂·4H₂O 2.5 mM, MgSO₄·7H₂O 0.7 mM, FeSO₄·7H₂O 0.6 mM. Esta solución se complementa cuando es necesario con el quelante de hierro Kelamix (35 mg/L) y con microelementos (0.4 g/L).

1.3 Condiciones de cultivo *in vitro*.

1.3.1 Esterilización: Las semillas se esterilizan en un eppendorf mediante la adición de 1ml de EthOH 70% y se mantienen en agitación durante 2 minutos. Posteriormente se descarta el EthOH 70% sobrante y se añade 1ml de EthOH 100% y se mantiene en agitación 2 minutos más. Finalmente se descarta el EthOH sobrante y se dejan secar a temperatura ambiente en esterilidad.

1.3.2 Siembra: Para los experimentos de sombra se resuspendieron las semillas en 1ml H₂O estéril y se sembraron 100 semillas de una en una en placas de petri de 9 cm, resultando en una densidad de 1.6 semillas/ cm².

1.3.3 Medios de cultivo: Durante la tesis se han germinado y crecido las plántulas de Arabidopsis en placa utilizado es el denominado MS 0.5x- sin vitaminas y MS-1 con vitaminas. Cuyas composiciones se indican a continuación:

Medio MS 0.5x- (1L)	Medio MS-1 con vitaminas (1L)
Murashige & Skoog 4,4 g (Basal Mixture Salts)	Murashige & Skoog 4,4 g (Basal Mixture Salts) with vitamins
MES 0,5 g	MES 1 g
	Sacarosa 10 g
Ajustar a pH 5,7 con KOH 1M	Ajustar a pH 5,7 con KOH 1M

Tabla 3. Composición del medio MS 0.5x- sin vitaminas y MS-1 con vitaminas.

Este medio se ha preparado con agua bidestilada-desionizada (MilliQ) y la mezcla se ha autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Para cultivo sólido en placa de Petri se ha de añadir agar (plant agar) al 0.8% (p/v) antes de autoclavar.

1.3.4 Suplementos añadidos al medio

Relación de suplementos utilizados en el medio de cultivo:

Tratamiento	Disolvente	Concentración de trabajo
Ácido abscísico (ABA)	agua	0.2 µM
Fosmidomicina (FSM)	agua	500 µM
Clomazona (CLM)	agua	50 µM
2- (4chlorophenylthio) triethylamine (CPTA)	agua	25 µM
Norflurazón (NFZ)	agua	5 µM
Lincomicina (LIN)	agua	1 mM
Cloramfenicol (CAP)	agua	50 µM

Kanamicina (KN)	agua	50 µg/mL
Higromicina (HYG)	agua	10 µg/mL
Picloram (PIC)	DMSO	5 µM
Epibrasinólido (EBL)	agua	1 µM
Gibberelinas (GA ₃)	agua	10 µM
Dexametasona (DEX)	EthOH 100%	2 µM

Tabla 4. Relación de compuestos añadidos al medio Medio MS 0.5x- o MS-1.

1.3.5 Condiciones de crecimiento y luz

Cámaras de sombra simulada:

La intensidad y la proporción de las diferentes longitudes de onda se ha medido gracias a un espectrómetro *SpectroSense2* que se encuentra asociado a un sensor de cuatro canales, que mide PAR (400-700 nm), B () R (664-674 nm) y FR (725-735 nm).

- Sombra por dosel: 22°C de temperatura, día continuo. Los tratamientos de luz W se han realizado mediante 4 tubos halógenos que producen una iluminación PAR sobre las muestras biológicas de $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, siendo el ratio R:FR final de 1.6. Para la suplementación de FR se han utilizado lámparas LED híbridas (Quantum devices) QB1310CS-670-735 resultando en un ratio R/FR en sombra simulada total de 0.025.
- Cámara que simula sombra por proximidad: 22°C de temperatura, día continuo. Los tratamientos de luz W se han realizado mediante 4 tubos halógenos de 32 W que producen una iluminación PAR de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, siendo el ratio R:FR final de 5. Para la suplementación de FR se han utilizado lámparas LED híbridas (Quantum devices) QB1310CS-670-735 resultando en un ratio R/FR en sombra simulada total de 0.05.

Cámara de cultivo *in vitro* de Día Corto (SD): 22°C de temperatura, 8h de luz y 16h de oscuridad, humedad relativa del 94%.

Cámara de cultivo *in vitro* de Día Largo (LD): 22°C de temperatura, 16h de luz y 8h de oscuridad, humedad relativa del 94%.

2. Vectores y construcciones

Construcción	Transformación	Descripción	Vector	Inserto
<i>HY5</i> (PCR II TOPO)	<i>E. coli</i> TOP 10	<i>HY5</i> flanqueado por sitios <i>Bam</i> HI	PCR II TOPO	PCR a partir de cDNA utilizando oligonucleótidos MO1 y MO3
<i>HY5-GR</i> (<i>pGREEN</i> 0029)	<i>E. coli</i> TOP 10	<i>35S:HY5-GR</i>	<i>pGREEN</i> 0029 - <i>35S:GR</i> , <i>Bam</i> HI/AP	<i>HY5</i> (PCR II TOPO), <i>Bam</i> HI
<i>35S:HY5-GR</i> (<i>pBinAr</i>)	<i>E. coli</i> TOP 10	<i>35S:HY5-GR</i>	<i>pBinAr</i> , <i>Sall</i> /KL/ <i>Xba</i> I/AP	<i>HY5-GR</i> (<i>pGREEN</i> 0029), <i>Eco</i> RI/KL/ <i>Xba</i> I
<i>35S:HY5-GR</i> (<i>pBinAr</i>)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101-pMP90	Plantas transformadas Col-0 y <i>hy5-2</i>		
<i>HY5</i> (<i>pDONOR</i> 207)	<i>E. coli</i> DH5 α	<i>HY5</i> flanqueado por sitios de recombinación attP1/ attP2	<i>pDONOR</i> 207	PCR a partir de <i>HY5</i> (PCR II TOPO) con oligonucleótidos AtHY5-attB1 F/ AtHY5-attB2 R
<i>HY5-GFP</i> (<i>pGWB</i> 405)	<i>E. coli</i> DH5 α	<i>35S: HY5-GFP</i>	<i>pGWB</i> 405 <i>35S:GFP</i>	Recombinación con <i>HY5</i> (<i>pDONOR</i> 207)
<i>HY5-GFP</i> (<i>pGWB</i> 405)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105	Plantas transformadas Col-0 y <i>hy5-2</i>		
<i>pBI-Hyg-35S-PhyB-GFP</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105	Proporcionado por Dr. Akira Nagatani. Plantas transformadas Col-0 y <i>hy5-2</i>		

Tabla 5. Vectores y construcciones generadas.

3. Oligonucleótidos

Uso	Oligo	Bases
Transgénicas	oMO 1	GAGGATCCATGCAGGAACAAGCGAC
	oMO 3	GAGGTACCATGCAGGAACAAGCGAC
	AtHY5-attB1 F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGC AGGAACAAGCGACTAGCTCTTTAG
	AtHY5-attB2 R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAAG GCTTGCATCAGCATTAGAACCACCAC
Genotipado	HY5 (hy5) Fw N679707	GGTAGAGAATCTGGATCGGC
	HY5 (hy5) Rev N679707	GCTGAGCTGAACTCTGTTC
	PSY-TDNA-F	gGAACTTTGCTTATGACACC
	PSY-TDNA-R	CCATCTATCTAAAGCCATGG
	DXS-cla1-F	AATGGATAGAGCTGGACTCG
	DXS-cla1-R	TGAGCCATAACCCAACAACG
	<i>lut2-3</i> LP Salk_005018	AGAAGCTTCTAATG
	<i>lut2-3</i> RP Salk_005018	CTTGCCACTGTTGC
	ABA2 F	CTTGTGTTCTTGATGTGACAG
	ABA2 R	ACATAAGAATGTGGACCAACG
	bHLH78-2 FW	TAAGTGAGTGAAGCTTCTGG
	bHLH78-2 Rev	TTG GAA CAC TAG TTG CGA GG
	LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
	LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
	GABI-8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC
qPCR	AtUBC qPCR F PAPER	CTG CTT GGA CGC TTC AGT CTG

	AtUBC qPCR R PAPER	CGC AGT TAA GAG GAC TGT CC
	AtUBC qPCR F	TCAAATGGACCGCTCTTATC
	AtUBC qPCR R	CACAGACTGAAGCGTCCAAG
	HY5 qPCR FW	CAAGCAGCGAGAGGTCATCA
	HY5 qPCR Rev	CATCGCTTTCAATTCCTTCTTG
	PSY	GAC ACC CGA AAG GCG AAA GG
	PSY	CAG CGA GAG CAG CAT CAA GC
	RTQ-PCR for PIL1 (F)	GGA AGC AAA ACC CTT AGC ATC AT
	RTQ-PCR for PIL1 (Rev)	TCC ATA TAA TCT TCA TCT TTT AAT TTT GGT TTA
	RTQ-PCR for HFR1 (F)	GAT GCG TAA GCT ACA GC ACT CGT
	RTQ-PCR for HFR1 (Rev)	AGA ACC GAA ACC TTG TCC GTC TTG
	Fw YUC8	AATGGACGCGGTTAAGATCG
	Rev YUC8	CCCCTTGAGCGTTTCGTG
	RTQ-PCR for PAR1 (F)	CAC CGT CAT GCT CAG CCA
	RTQ-PCR for PAR1 (Rev)	TCG GTC TTC ACG TAC GCT TG
ChIP	qIAA7(C+) F	ACTAACATCTAATCAAGCCCAC
	qIAA7(C+) R	AAGAAGAAAGGAGAGGAAGGG
	qHAT2(C+) F	ATCATGCTTTGCGGACTCTC
	qHAT2(C+) R	GTTGTGTTTCAGTGTGATCTGG
	qELF3 (C+) F	TTACTTTCTAGTTTCTTATT
	qELF3 (C+) R	AACTACGATAGAGATCTCAC
	qXTH5 (C+) F	GGTGGTATCTGGTGTCAAATAG
	qXTH5 (C+) R	GTGATTGCATAAGAGGTGTTG
	qEXP2 (C+) F	ACATGTGAATCTGTGATGCG

qEXP2 (C+) R	CAACGGGCAACGGCTATA
qXTH21 (C+) F	TGTTTGTGTGTCTAACGACGT
qXTH21 (C+) R	TACTGTTACGTTTTTTTTCCG
qGUN5(C+) F	ACTCAACCTCACAAGTAGACTC
qGUN5(C+) R	TAAGTGGTGAGAGGGAAGGA

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados.

4. Generación de construcciones

4.1 . Material

- Cepas bacterianas utilizadas**

En esta tesis doctoral se ha trabajado con las siguientes cepas bacterianas:

Organismo	Cepa	Descripción
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	Empleada en el clonaje y la propagación de vectores
<i>Escherichia coli</i>	TOP10	Empleada en el clonaje y la propagación de vectores
<i>Escherichia coli</i>	DB3.1	Empleada para replica los plásmidos Gateway debido a que es inmune a los efectos del gen <i>ccdB</i> que se encuentra en el casete de Gateway.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	EHA 105	Empleada para la transformación de plantas mediante el método de inmersión floral. Resistencia a Rifampicina
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3101-pMP90	Empleada para la transformación de plantas mediante el método de inmersión floral Resistencia a Rifampicina + Gentamicina

Tabla 7. Relación de cepas bacterianas.

- Medios de cultivo.**

Las cepas de *E. coli* se han crecido en el medio LB mientras que para el crecimiento de *A. tumefaciens* se ha utilizado el medio YEB, aunque también crece adecuadamente pero más lentamente en el medio LB. La composición de los medios se indica a continuación:

Medio LB (1L)	Medio YEB (1L)
Triptona 10 g	Peptona 5 g
Extracto de levadura 5 g	Extracto de levadura 1 g
NaCl 10 g	Extracto de ternera 5 g
	Sacarosa 5 g
	MgSO ₄ 0,48 g

Tabla 8. Composición de los medios LB y YEB.

Los medios se han preparado con agua bidestilada-desionizada (MilliQ) y la mezcla se ha autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Cuando se emplean en cultivo sólido en placa de Petri se ha de añadir agar bacteriológico al 1.5% (p/v) antes de autoclavar.

- **Antibióticos para restringir el crecimiento bacteriano**

Antibiótico	Stock	Disolvente	E.coli	<i>A.tumefaciens</i>
Carbenicilina	100 mg/ml	etanol 50%	100 µg/ml	
Kanamicina	50 mg/ml	agua	50 µg/ml	
Cloranfenicol	20 mg/ml	etanol 50%	20 µg/ml	
Gentamicina	200 mg/ml	agua		50 µg/ml
Spectinomicina	100 mg/ml		100 µg/ml	
Rifampicina	50 mg/ml	DMSO		25 µg/ml

Tabla 9. Relación de antibióticos empleados.

4.2 Métodos de clonaje de genes

4.2.1 PCR

Se han empleado dos enzimas DNA polimerasa distintas según el uso que se haga del fragmento amplificado. Así, para hacer comprobaciones o genotipar, se ha utilizado una Taq de baja fidelidad, mientras que para clonar el producto de PCR, se ha utilizado una Taq de alta fidelidad:

- Polimerasas utilizadas

Enzima comercial	Tª	Fidelidad
	extensión	
GoTaq® Green Master Mix (Promega)	72°C	baja
AccuPrime™ Taq DNA Polymerase, High Fidelity (Invitrogen)	68°C	alta

Tabla 10. Enzimas Taq utilizadas.

- Composición de la reacción

Producto	[] inicial	[] final	volumen
Tampón de reacción	10x	1x	3 µL
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	1 µL
dNTPs	2.5 mM (cada)	200 µM	2.4 µL
Oligonucleótido F	10 µM	0.5 µM	1.5 µL
Oligonucleótido R	10 µM	0.5 µM	1.5 µL
Taq (1 U/µL)	1 U/µL	1 U	1 µL
DNA	25 ng/µL	10 ng	0.4 µL
Agua destilada estéril	-	-	19.2 µL
			30 µL

Tabla 11. Composición de una mezcla de reacción de PCR estándar.

- Programa de ciclos

Etapas	Tª extensión	Tiempo
Desnaturalización	94°C	4 min
Desnaturalización	94°C	45 sec
Anillado	T _m °C	45 sec
Extensión	Text Taq	1 min/Kb
		Repetir 30 ciclos
Extensión final	Text Taq	5 min

Tabla 12. Programa de ciclos de temperatura de una PCR estándar.

4.2.2 Introducción de fragmentos de ADN en vectores plasmídicos

- Sistema TOPO® TA y clonaje por enzimas de restricción

Este sistema de clonaje se utilizó para la generación de la construcción 35S:HY5-GR [hy5-2], donde se amplificó el gen HY5 junto con dianas de restricción flanqueantes para después introducirlo en PCRII.

Para que la reacción tenga lugar se ha de mezclar el vector suministrado (pCRII/pCR2.2) con el producto de PCR fresco en presencia de sales e incubarlo a temperatura ambiente durante 5 minutos para posteriormente transformarlo en células competentes de *Escherichia coli* según el apartado 3.2.3.

Para el sistema de clonaje convencional es necesaria la digestión de fragmentos y su posterior ligación en otros vectores. Para ligar fragmentos de ADN se emplea la enzima comercial ligasa del fago T4 de Roche.

Componente	Volumen
Inserto de ADN	ng calculados
Plásmido	40-50 ng
Tampón 10x	1 µL
Ligasa T4	1 µL (1 U)
Agua estéril	hasta 10 µL

Tabla 13. Composición de la ligación

Para optimizar la reacción de ligación se incubó a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se transforma en células competentes de *Escherichia coli*.

En nuestro caso, el vector PCRII junto con HY5 se digirió según el apartado 3.2.4 y se introdujo mediante ligación en un vector digerido con enzimas compatibles que ya poseía el dominio GR clonado (pGreen 0029). Este vector a su vez fue digerido introduciendo el fragmento HY5-GR en un vector binario pBinAr previamente digerido mediante ligación. Este vector se utilizó para transformar plantas *hy5-2* por inmersión floral mediante *Agrobacterium*.

- Sistema GATEWAY

Este sistema no requiere reacciones de ligación, sino que utiliza reacciones de recombinación muy específicas. Este tipo de clonaje se utilizó para generar las construcciones 35S:*phyB-GFP*, 35S:*phyB-GFP[hy5-2]* y 35S:*HY5-GFP[hy5-2]*. Los productos generados mediante PCR tanto de *HY5* como de *phyB* se flanquearon por las secuencias reconocidas para la reacción de recombinación *attB* y se introdujeron en un vector pDONOR 207 mediante una reacción BP obteniendo el pDONOR junto con el gen de interés (pDONOR GI). Posteriormente fueron introducidas en un vector pDEST, en concreto el vector binario pGWB 405 (Nakagawa et al. 2007) mediante una reacción LR. Este vector es poseedor de la secuencia de la GFP en el extremo 3' al sitio de recombinación del gen de interés. Este vector se utilizó para transformar plantas *col-0* y *hy5-2* por inmersión floral mediante *Agrobacterium*.

Ambas reacciones BP y LR se realizaron según las recomendaciones de la casa comercial Invitrogen:

Componentes	volumen
Producto de PCR attB-PCR	1-7 μL
Vector pDONOR	1 μL
Buffer TE pH=8	Hasta 8 μL
BP clonasa	2 μL
	10 μL

Tabla 14.Reacción BP

La reacción BP se incubó durante 1h a temperatura ambiente y posteriormente se transformó en células competentes de *Escherichia coli*.

Componentes	volumen
pDONOR (GI)	1-7 μL
Vector pDEST	1 μL
Buffer TE pH=8	Hasta 8 μL
LR clonasa	2 μL
	10 μL

Tabla 15.Reacción LR.

Para mejorar la eficiencia de la reacción se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente estas construcciones se transformaron en células competentes de *Escherichia coli*. Estos vectores se utilizaron para transformar plantas *hy5-2* por inmersión floral mediante *Agrobacterium*.

4.2.3 Transformación de *Escherichia coli*

En esta tesis se ha usado la transformación de células competentes por choque térmico.

1. En condiciones estériles añadir a una alícuota de células competentes (descogeladas en ese momento) la cantidad de ADN necesaria. Si se trata de ADN plasmídico recuperado por mini-prep 0.5 μL resultan más que suficientes. Si se trata de una ligación se transforman directamente los 10 μL preparados.
2. Dejar reposar en hielo durante 30 min.
3. Aplicar un choque térmico de 42 °C durante 1 min. en un bloque o un baño.
4. Devolver el tubo al hielo y mantenerlo 5 min. más.
5. Añadir 1 mL de medio LB estéril y previamente atemperado a 37 °C.
6. Incubar las células a 37 °C y 180 r.p.m. durante 1h.

7. Plaquear en LB sólido (con un antibiótico) para seleccionar las células que incorporaron la construcción.

8. Incubar toda la noche a 37°C.

9. Al día siguiente inocular en 5ml de LB junto con los antibióticos pertinentes las colonias deseadas y incubar toda la noche a 37°C.

Para la obtención del DNA plasmídico a partir del cultivo crecido, en el laboratorio hemos usado el sistema comercial “High pure plasmid isolation kit” de Roche. El protocolo detallado se puede encontrar en el manual del kit.

4.2.4 Digestión con enzimas de restricción y reacción Klenow

Este procedimiento ha sido empleado ampliamente a lo largo del trabajo doctoral con dos finalidades principales: preparar fragmentos de ADN a unir posteriormente durante un clonaje y como método para la comprobación de las construcciones generadas. En el primer caso, y dependiendo del número de pasos de la estrategia de clonaje, se suele digerir en torno a 4 mg de ADN. En el caso de restricciones analíticas, una digestión de 0.5 µg es suficiente.

Componentes	Volumen
Solución a cortar	vol. necesario para digerir entre 0.5-4 µg
Enzima 1 (10U/µL)	1 µL
Enzima 2 (10U/µL) -si se requiere-	1 µL
Tampón 10x	1/10 del vol. final
Agua destilada estéril	hasta 40 µL

Tabla 16. Mezcla para digerir un fragmento de ADN

La enzima Klenow permite la posibilidad de generar extremos romos a partir de un extremo inicialmente protuberante. Esta enzima se ha utilizado para introducir el fragmento *HY5-GR* en el vector binario pBinAR.

Para llevar a cabo la reacción se utilizan entre 1-3 µg de DNA, 1U/µg de enzima y se incubó en presencia del tampón de reacción (50 mM Tris-HCl (pH 7,2), 10 mM MgSO₄, 0,1 mM DTT, 40 µM de cada uno de los desoxinucleótidos fosfato, y 20 µg/mL BSA acetilada) a temperatura ambiente durante 10 min.

4.2.5 Electroforesis en gel de agarosa y purificación de bandas

Los fragmentos generados de ADN se pueden visualizar mediante la electroforesis en gel de agarosa, que se caracteriza por separarlos en función de su peso molecular. En nuestro caso el gel se prepara con tampón TAE (Tris 40 mM, Acetato 19 mM, EDTA 1 mM) con un 1% de agarosa (p/v), se calienta en el microondas posteriormente, se

añade una concentración final de bromuro de etidio de 1 µg/mL. Una vez enfriado totalmente, se introduce en una cubeta de electroforesis junto con las muestras de ADN y se administra un voltaje de 70 a 100 V.

Para comparar los tamaños se utiliza un marcador de pesos comercial, 1Kb ladder (Biotools).

Durante el proceso de clonaje, estos fragmentos específicos se tienen que purificar para introducirlos posteriormente en otro vector. Para ello, hemos utilizado el sistema comercial “High pure PCR purification kit” de Roche que permite la purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.

4.2.6 Secuenciación

La secuenciación se ha realizado mediante el Servicio de Secuenciación del CRAG donde emplean un método de secuenciación automática basado en el uso de dideoxinucleótidos por el método de Sanger (Sanger & Coulson 1975).

5. Generación de plantas transgénicas

5.1 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción deseada

1. En condiciones estériles añadir a una alícuota de células competentes (descongeladas en ese momento) entre 1-2 µg de ADN. Homogeneizar la mezcla y mantener en hielo durante 20 min.
2. Congelar la mezcla en N₂ líquido durante 1 min y a continuación provocar un choque término incubando la mezcla a 37 °C 5 minutos.
3. Añadir 1 mL de medio YEB estéril e incubar las células a 28 °C y 200 r.p.m. durante 2h.
4. Plaquear en YEB sólido con los antibióticos propios de la cepa bacteriana utilizada (**Tabla.4**) y los antibióticos propios del vector binario a seleccionar.
5. Incubar la placa a 28 °C durante 2-3 días protegida de la luz hasta que se aprecien colonias visibles.

Una vez transformadas las células de *A. tumefaciens* con nuestro vector se puede realizar la transformación estable o transitoria de plantas.

5.2. Transformación transitoria en tabaco.

En nuestro caso, se ha realizado la transformación transitoria para validar la construcción y la capacidad infectiva del *Agrobacterium* antes de realizar la transformación estable, así como para obtener resultados preliminares.

El procedimiento experimental se detalla a continuación:

1. Inocular 5 mL de medio YEB líquido (con antibióticos selectivos) a partir de una colonia transformada (comprobado por PCR que adquirió el vector). Incubar durante 12h a 28 °C y 200 r.p.m.
2. Inocular 20 mL de medio YEB líquido (con antibióticos selectivos) con 400µl del precultivo. Incubar durante 12h a 28 °C y 200 r.p.m.
3. Medir con el espectro fotómetro una dilución 1:5 del cultivo a 600nm con tal de determinar la OD del cultivo.
5. Centrifugar 10 min a 4000 r.p.m. a temperatura ambiente.
6. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento con suavidad con un volumen de solución de agroinfiltración adecuado para conseguir una OD=1. El volumen de resuspensión se calcula según:

$$\text{Volumen de suspensión} = \frac{\text{Volumen del cultivo inicial} \times \text{OD medida}}{\text{OD deseada}}$$

La composición de la solución de agroinfiltración es:

Solución de agroinfiltración

MgCl₂ 10 mM

MES 10 mM (pH=6)

Acetosiringona 150 mM (disuelta en DMSO)

Tabla 17. Composición de la solución de agroinfiltración.

7. Incubar durante 2h a temperatura ambiente.
8. Mezclar las suspensiones de *A. tumefaciens* de cada construcción transformada en una relación 1:1.

Se recomienda realizar los mismos pasos descritos también con células de *Agrobacterium* que contengan el plásmido pTRANS5'TEV donde se ha clonado el gen que codifica para la proteína supresora del silenciamiento HC-Pro del potyvirus Tobacco etch virus. La actividad transitoria de esta proteína ayuda a evitar el silenciamiento pos-transcripcional inducido por la introducción de transgenes o genes víricos de forma transitoria en tabaco.

Por lo tanto, cuando se realizan las mezclas de *A. tumefaciens* transformado, sería necesario incluir la suspensión de *A. tumefaciens* con HcPro en relación 1:1.

Las plantas de tabaco a agroinfiltrar deben tener entre 3-5 semanas y estar libres de inflorescencias. El momento óptimo de agroinfiltrado es de hecho justo antes de que las plantas florezcan. Las hojas más adecuadas para transformar son de entre todas las

de tamaño grande, las tres más jóvenes. El proceso consiste en inyectar de forma muy lenta la suspensión de *Agrobacterium* a través de la superficie abaxial de las hojas, entre la cutícula y la epidermis, mediante una jeringa de 1mL sin aguja.

5.3 Transformación estable de *Arabidopsis* mediante *Agrobacterium*

1. Crecer 3-5 plantas por tiesto (diámetro 9 cm) bajo un fotoperiodo de día corto durante un mínimo de 16 días para potenciar el crecimiento vegetativo
2. Pasarlas a una cámara de día largo donde se inicie la fase reproductiva y por tanto la floración.
3. Esperar 2 semanas y cuando se observen los primeros primordios florales cortar el tallo por la base. De esta forma aseguramos el máximo número de flores con botones florales cerrados y sin fecundar. Para simplificar el proceso de escrutinio posterior de semillas transformadas se recomienda cortar y eliminar el máximo de silicuas formadas y flores en estadio post-antesis posible.

La transformación se ha realizado según el protocolo de inmersión floral (Clough & Bent 1998):

1. Inocular 5 mL de medio YEB líquido (con antibióticos selectivos) a partir de una colonia transformada (comprobado por PCR que adquirió el vector). Incubar durante dos días a 28 °C y 200 r.p.m.
2. Inocular 500 mL de medio YEB líquido (con antibióticos selectivos) con 2ml del de precultivo. Crecer el cultivo durante un día a 28 °C y 200 r.p.m.
3. Centrifugar 10 min. a 4000g a temperatura ambiente.
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento con suavidad en 300 mL de una solución estéril de sacarosa al 5% (p/v).
5. Añadir 90 µL del agente surfactante Silwet-77 (0.02% -v/v-) a la suspensión celular y homogeneizar bien.
6. Colocar la esta solución de agroinfiltración en un vaso de precipitados e introducir las plantas boca debajo de tal forma que no se moje el sustrato y que queden totalmente sumergidos los botones florales. Esperar 5 min.
7. Colocar las plantas recién transformadas horizontalmente sobre papel secante en una bandeja. Cubrir la bandeja con film de plástico transparente para retener humedad y dejarla en una cámara de crecimiento en penumbra durante dos días.
8. Cuando se observe cómo las inflorescencias se curvan en busca de la luz se puede eliminar el plástico y devolver las plantas a la posición vertical para que acaben su ciclo de crecimiento (y podamos recoger todas las semillas).

- Selección de plantas de *Arabidopsis* transgénicas homocigotas para el transgen. La planta madre transformada se denomina T₀. De todas las semillas obtenidas en la generación T₁, sólo algunas incorporarán el transgen (aquellas donde se haya transformado el gametofito femenino). En las que resulten positivas, el transgen se podrá haber incorporado una o varias veces en el genoma.

Para seleccionar los individuos que hayan incorporado el transgen se utiliza el marcador de selección presente en el T-DNA insertado determinada por el vector binario utilizado.

1. Sembrar el máximo número de semillas transformadas T₁ en un medio con el herbicida determinado por el vector binario utilizado. A los 10-15 días seremos capaces de diferenciar la presencia de plantas resistentes, aquellas que sean capaces de desarrollar hojas verdaderas.
2. Transferir los individuos resistentes a macetas para que completen su ciclo biológico, se autofecunden y produzcan semillas (T₂).
3. Sobre la generación T₂ se analiza el número de copias de T-DNA que se han incorporado al genoma. Para ello se siembran 100 semillas en placas de medio con el herbicida utilizado anteriormente y se observa el porcentaje de individuos T₂ resistentes. Las líneas que segregan en una proporción mendeliana 1:3 (sensibles:resistentes) se escogen ya que presentan una única copia del transgen en el genoma de la planta.
4. Unos 10 individuos con las características descritas anteriormente se trasladan a macetas para completar su ciclo y obtener semillas (T₃).
5. Por último, para seleccionar líneas uniformes en cuanto al carácter de resistencia al herbicida (y homocigotas para el transgen) se tiene que confirmar que todas las semillas descendientes de una planta T₂ (generación T₃) sean resistentes al marcador.

6. Genotipado de líneas mutantes de *Arabidopsis*

6.1 Extracción de ADN genómico para genotipar

Se recomienda partir de poca cantidad de material vegetal previamente congelado a -80 °C. El protocolo consta de los siguientes pasos,

1. Recoger 10 plantulas o si se parte de planta adulta, una hoja de la roseta es suficiente.
2. Congelar a -80°C
3. Introducir el material congelado en un tubo Eppendorf y triturarlo con ayuda del *TissueLyser*.
4. Añadir rápidamente 400 µl del tampón TENS (**Tabla 18**) y mezclar de forma suave para homogeneizar la mezcla.

5. Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 5 min a temperatura ambiente. Transferir el sobrenadante a tubo nuevo evitando recoger los restos del tejido.
6. Precipitar el ADN con isopropanol volumen 1:1 e incubar durante 30 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 15 min. a temperatura ambiente.
8. Eliminar el sobrenadante con cuidado y lavar el sedimento con 500 μ L de etanol 70%.
7. Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 5 min a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet a temperatura ambiente. De forma alternativa puede secarse durante 15 minutos en el speedvac a temperatura ambiente.
8. Resuspender el ADN en 30-50 μ L de agua estéril. Conservar a -20 °C.

Tampón TENS

Tris-HCl 200 mM (pH=7)

NaCl 250 mM

EDTA 25 mM

SDS 0.5%

Tabla 18. Composición del tampón TENS

6.2 Método de genotipado de líneas mutantes de *Arabidopsis*

Los individuos de las líneas mutantes por inserción de T-DNA se han genotipado como homocigotos, heterocigotos o acigotos para el T-DNA mediante PCR con oligonucleótidos propios del elemento insertado y de la región genómica que flanquea al lugar de inserción del mismo. El diseño de oligonucleótidos se ha determinado gracias a las instrucciones descritas en la página web del instituto SALK (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>). Por otra parte, por ejemplo en el caso del mutante *aba2* donde hay una delección de 53 pb en el gen *ABA2* (Cheng et al. 2002), se han diseñado oligonucleótidos flanqueantes al punto de delección para así determinar mediante electroforesis si el gen está o no truncado.

7. Generación de dobles mutantes

Durante esta tesis se han realizado doble mutantes como *hy5-2 psy-1*, *hy5-2 hdr-1*, *hy5-2 dxs-1*, *hy5-2 lut2*, *hy5-2, hy5-2 hds-3*, *hy5-2 gun5-1*. Para realizar el cruce de mutantes se ha utilizado siempre como planta madre el mutante *hy5-2* y como plantas padres, dadores de polen los mutantes *psy-1*, *hdr-1*, *dxs-1*, *lut2*, *gun5-1*. Con tal de asegurar que los ovarios a cruzar fuesen receptivos a la fecundación pero que no estuviesen autopolinizados con anterioridad, se escogieron 2-3 flores jóvenes inmediatamente antes de la antesis (cuando los pétalos se abren). Con ayuda de unas

pinzas se esmacularon y se pusieron en contacto con el polen de una flor en un estadio de post-antesis del otro mutante a cruzar mediante un frotamiento suave.

Una vez acabado el proceso, se eliminan el resto de capullos florales, flores y frutos (silicuas) de la inflorescencia para favorecer que el cruce reciba un aporte suficiente de nutrientes para la formación de las semillas. Es recomendable cubrir la inflorescencia con un papel albal transparente durante un par de días para evitar pérdidas de polen, así como de preservar su humedad. Si la fecundación ocurre con éxito, se acabará desarrollando un silicua con las semillas que serán F1. Mediante el genotipado se propagarán hasta conseguir plantas azigotas (mutantes) para ambos alelos. En el caso de los dobles mutantes *hy5-2 psy-1*, *hy5-2 hdr-1*, *hy5-2 dxs-1*, debido a que en homocigosis para *psy-1*, *hdr-1*, *dxs-1* resultan albinas y sin capacidad de reproducirse, se conservaron los dobles mutantes como azigotos para *hy5-2* y heterocigotos para *psy-1*, *hdr-1*, *dxs-1*. De tal forma que para realizar la caracterización de estos dobles mutantes se seleccionaron las plantas albinas que resultan de la segregación del alelo mutante *psy-1*, *hdr-1*, *dxs-1*.

8. Determinación de niveles de transcritos

8.1 Extracción de ARN

Para la extracción del ARN se ha utilizado el kit comercial *PureLink® RNA Mini Kit* de *Ambion* (de purificación por columna) y se ha seguido el protocolo detallado en el manual.

En nuestro caso el material después de ser recogido, se congeló en nitrógeno líquido y se trituró gracias al *tissue lyser* de Qiagen. Para eliminar el posible DNA genómico que se pueda extraer en conjunto con el RNA, se ha realizado un tratamiento de DNasa comercial *PureLink® DNase Set* de *Ambion* aplicándolo en la misma columna del kit.

8.2 Cuantificación de ARN

Para cuantificar la cantidad de ARN se ha utilizado el espectrofotómetro *NanoDrop 1000* de *Thermo Scientific* a 260 nm. Un valor de DO=1 corresponde aproximadamente a 50 µg/mL de DNA y a 40 50 µg/mL de RNA. La pureza de los ácidos nucleicos se ha determinado según la tabla siguiente:

Relación	Indica	Valor ideal
260/280	contaminación con proteínas	2 (ARN), 1.8 (ADN)
260/230	contaminación con solventes orgánicos	1.8-2.2 (ambos)

Tabla 19. Relaciones para cuantificar la pureza de los ácidos nucleicos tras su extracción.

8.3 RT-PCR.

La composición estándar de la mezcla de reacción de RT-PCR y el programa de temperatura (según el protocolo del kit de Roche “Transcriptor First Strand cDNA synthesis”) son los siguientes:

Producto	[] inicial	[] final	volumen
RNA molde	1 mg de RNA total		hasta 12 μ L
Oligonucleótido poliT	10 μ M	0.5 μ M	1 μ L
Agua destilada estéril			hasta 13 μ L
			<i>10 min a 65 °C</i>
Tamón de reacción	5x	1x	4 μ L
dNTPs	2.5 mM (cada)	1 mM	2 μ L
Protector inhibidor de RNAsa	40 U/ μ L	20U	0.5 μ L
Agua destilada estéril	20 U/ μ L	10U	0.5 μ L
			20 μ L
			<i>1 h a 45 °C</i>
			<i>5 min a 85 °C</i>

Tabla 20. Composición de la mezcla y programa de temperatura de la reacción de RT-PCR.

8.4 PCR cuantitativa

Esta técnica permite la cuantificación del producto acumulado en cada ciclo de amplificación mediante la generación de una señal fluorescente, directamente relacionada con la síntesis de nuevas moléculas de ácidos nucleicos. Para ello, el agente reportero más usado es el reactivo *SYBR Green I*, un fluoróforo capaz de unirse al surco menor del ADN de doble cadena de tal manera que el aumento en la señal fluorescente es proporcional al aumento de productos de la reacción de PCR.

Las reacciones de PCR se han realizado en el equipo *Roche Light Cycler*® 480. La mezcla de reacción y el programa de PCR empleados son:

Mezcla de reacción de qPCR	
SYBR Green I master MIX	10 μ l
Oligonucleótido F (300 nM)	0.6 ml
oligonucleótido R (300 nM)	0.6 ml
cDNA molde (50 ng molde)	1 ml
agua	7.8 ml

Tabla 21. Composición de la mezcla de reacción de qPCR.

Etapa	Tª extensión	Tiempo
Activación	95 °C	10 min
Desnaturalización	95 °C	10 seg
Anillado	60 °C	30 seg
<i>Repetir 45 ciclos</i>		

Tabla 22. Programa de qPCR.

El análisis de los resultados se ha hecho mediante una cuantificación relativa. En este cálculo se realizan dos normalizaciones:

1. Se normaliza el número de copias del gen de estudio (E) respecto a las de un gen de referencia o normalizador (N). Los niveles de expresión del gen normalizador deben ser estables en las condiciones del estudio que se quiera realizar. Nosotros hemos usado el gen *UBC* (Czechowski et al. 2005).

2. Se normaliza en número de copias de la muestra desconocida con respecto a un control no tratado, un tiempo 0 o un individuo silvestre

La expresión relativa (ER) se calcula a partir de la siguiente fórmula (Pfaffl 2001),

$$ER = E_E^{\Delta Ct} / E_N^{\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct = Ct_{control} - Ct_{desconocida}$$

donde Ct es aquel ciclo de amplificación (C) en el que el valor de la señal fluorescente está significativamente por encima del ruido de fondo (del inglés “threshold cycle”, Ct) y E_E , E_N hacen referencia a la eficiencia de la reacción de amplificación de los genes de estudio (E) y normalizador (N).

9. Determinación de niveles de proteína

9.1 Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas de HY5-GFP se ha realizado el siguiente protocolo:

1. Recoger aproximadamente 100 mg de tejido fresco en un eppendorff de 2ml y congelar la muestra en N₂ líquido
2. Triturar las muestras con el equipo Tissue Lyser (Qiagen) -sin dejar que la muestra se descongele en ningún momento hasta conseguir un polvo fino y uniforme.

Condiciones: 2 ciclos de triturado de 45” cada uno a una frecuencia de 29 Hz

3. Añadir un volumen de 100 µL de tampón de extracción (**Tabla 23**). Mezclar y reservar en hielo 5 minutos
4. Centrifugar la suspensión a 13000 r.p.m 5 min a 4 °C.
5. Descartar el pellet y recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo.

6. Reservar una pequeña alícuota de la extracción para realizar la cuantificación por bradford y el resto resuspenderlo en tampón de carga 4x (**Tabla 24**) de tal forma que todo el extracto tenga tampón de carga 1x. De esta forma las proteínas se mantienen más estables durante meses a -20°C y se previene su precipitación debida a la congelación y descongelación de las muestras.

Tampón de extracción de proteínas

Ethylene glycol	50%
Tris HCl pH 8.5	100 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	150 mM
EDTA	150 mM
NaHSO ₃	60 mM
DTT	1 mM
PMSF	100 µg/ml
E64	3 µg/ml
<i>Protease inhibitor cocktail (Sigma)</i>	20 µg/ml
H ₂ O destilada	

Tabla 23 Composición del tampón de extracción de proteínas

Tampón Carga 4x

Tris -HCl (6,8)	250 mM
2-Mercaptoetanol	4%
SDS	8%(p/v)
Glicerol	40 %(v/v)
Azul de Bromofenol	0,02% (p/v)

Tabla 24 Composición del tampón de carga de proteínas

9.2 Determinación de la cantidad de proteína total

La determinación de la cantidad de proteína total se realizó según la instrucciones del fabricante mediante el reactivo comercial Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories). Se cuantificaron 2 µl de extracción de proteínas por muestra y por triplicado en un volumen final de 1ml.

9.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida

La composición de los dos geles que conforman el gel de electroforesis SDS-PAGE (Sodium DodecylSulfate PoliAcrylamide Gel Electrophoresis), se basa en la adición de la mezcla comercial de acrilamida/ bisacrilamida en función del tamaño del poro deseado, además de persulfato amónico (APS) y tetrametilendiamina (TEMED) que inducen la polimerización del gel. En nuestro caso, por el tamaño de HY5-GFP

realizamos un gel separador con un 15% de acrilamida/ bisacrilamida (**Tabla 25**), utilizando el sistema de geles (Mini-Protean II. Bio-Rad).

Antes de cargar la muestra (que se encuentra ya en Tampón de carga x1), la descongelamos a temperatura ambiente durante 5 minutos en agitación y la desnaturalizamos durante 5 min a 95°C, posteriormente realizamos un “spin” en la centrifuga.

Finalmente, sabiendo la concentración de la proteína por Bradford y teniendo en cuenta la dilución realizada con el tampón de muestra, calculamos el volumen necesario para cargar los µg de proteína total deseados. Para igualar volúmenes entre muestras se debe utilizar Tampón de muestras 1X. De esta forma, todas las muestras estarán con la misma concentración de tampón de muestra (1X). El tampón de electroforesis utilizado se describe en la **Tabla 26**. El voltaje aplicado fue de 100 V durante alrededor de 1h 30 min.

Preparación de un gel de poliacrilamida			
Gel Separador (15%)		Gel Concentrador	
H ₂ O destil·lada	2812 µl	H ₂ O destil·lada	2870 µl
Ac/Bis (40%)	2585 µl	Ac/Bis (40%)	500 µl
Tris Hcl 1'5M	1950 µl	Tris Hcl 1'5M	500 µl
SDS 5%	100 µl	SDS 5%	40 µl
APS 10%(^P / _V)	50 µl	APS 10%(^P / _V)	40 µl
TEMED	3 µl	TEMED	4 µl
TOTAL	7500 µl	TOTAL	4000 µl

Tabla 25. Composición del gel de poliacrilamida

Tampón Electroforesis	
Tris –HCl	0,25 M
Glicina	1,92 M
SDS	1 % (p/v)

Tabla 26. Composición del tampón de electroforesis

Por último, para determinar la carga de proteína total de cada muestra, se tiñeron los geles mediante coomassie R-250 durante 15 min en agitación y temperatura ambiente. Para desteñirlos, se utilizó la solución de desteñido (**Tabla 27**).

Tinción por Coomassie		Solución de desteñido	
Coomassie R-250	0,2 % (p/v)	Metanol	20 – 40 % (v/v)
Etanol	40 % (v/v)	Acido acético	10 % (v/v)
Acido acético	10 % (v/v)	Agua	Hasta 100 %
Agua	50 % (v/v)		

Tabla 27. Composición de las soluciones para teñir por coomassie y desteñir.

9.4 Western-blot

La transferencia de proteínas se ha realizado mediante el sistema Trans-Blot Semi-dry Transfer Cell (BioRad) y hemos utilizado la membrana de transferencia de PVDF (Hybond-p, Amersham Biosciences) que requiere de una previa activación durante 5 segundos con metanol.

Para conseguir una transferencia completa de las proteínas se ha aplicado un amperaje de 12-15 mA durante 45 minutos con el tampón de transferencia 1x descrito en la **Tabla 28**.

Tampón Transferencia 10x	
Tris	140 g
Glicina	30 g
Agua	hasta 1L
Metanol	10%

Tabla 28. Composición del tampón de transferencia

Una vez finalizada la transferencia, se recupera la membrana y se procede a su incubación con el anticuerpo primario (α -GFP) y el anticuerpo secundario, que es capaz de reconocer el anticuerpo primario y a su vez lleva unida la enzima peroxidasa de rábano.

1. Realizar un lavado de la membrana con tampón PBS 5 minutos.
2. Bloquear la membrana: incubar la membrana con PBS + TWEEN20 al 0,05% (v/v) + 10% leche desnatada en polvo 1h con agitación suave.
3. Incubar la membrana durante toda la noche a 4°C con agitación suave con de PBS + TWEEN 0.05% +Leche 5% a la que se le añade el anticuerpo primario (en nuestro caso, diluido 1:1000).
4. Lavar la membrana con PBS-TWEEN 0.05% en (5ml) durante 5 minutos (x3)
5. Incubar durante 1h a temperatura ambiente con solución PBS + TWEEN 0.05% +Leche 5% a la que se le añade un anticuerpo secundario a la dilución establecida

6. Lavar con solución de PBS-TWEEN 0.05% durante 5 minutos (x3).
7. Para el revelado se ha utilizado el reactivo comercial ECL+Plus según las instrucciones del fabricante
8. Para la detección y tratamiento de la señal quimioluminiscente generada se utilizó el sistema LAS4000[®] de Fujifilm.

9.5 Cuantificación de señal bioluminiscente

Para la determinación de la cantidad de proteína se ha utilizado el software ImageJ y se han relativizado los valores asociados a la intensidad de la banda a los valores asociados a la intensidad de la banda control (en nuestro caso, se trata de una banda que no varía en función del tratamiento con inhibidor y se encuentra en todas las muestras).

10. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Para la inmunoprecipitación de la cromatina se ha utilizado una variante del protocolo del laboratorio de Rob Martienssen.

10.1 *Crosslink* de la muestra vegetal

Con tal de obtener suficiente tejido se han sembrado por cada muestra 3 o 4 placas cuadradas de 10 cm x 10 cm que contienen un total de 100 µl de semillas/ placa.

1. Recoger el tejido en falcons de 50 ml después de 7 días de crecimiento.
2. Realizar un saquito de Miracloth e introducir las plántulas dentro de este.
3. Introducir el saquito dentro de un vaso de precipitados de 1L que contenga agua MilliQ estéril y 1% formaldehído preparado en el momento. Preparar a 4°C y a partir de aquí siempre trabajar en frío.
4. Aplicar el vacío durante 15 min a 800mbar (x2). Remover entre vacío y vacío
5. Parar la reacción de *crosslink* añadiendo una concentración adicional de glicina hasta 0.125M y aplicar el vacío 5 minutos más.
6. Lavar el saquito con agua milliQ estéril (x3)
7. Secar bien el saquito posándolo sobre papel absorbente hasta que deje de mojarlo.
8. Congelar con nitrógeno líquido y pulverizar. La cantidad ideal de material pulverizado tiene que ser de al menos 5ml por muestra. En este punto se puede congelar el material vegetal a -80 °C hasta su posterior extracción.

10.2 Preparación de los *Dynabeads*

Se han utilizado las *dynabeads* unidas a la proteína A de Thermo Fisher Scientific que se caracterizan por ser fácilmente recuperables en presencia de un soporte imantado. Esta característica resulta muy práctica tanto a nivel de rapidez como de rendimiento en la recuperación de la proteína unida al ADN. Todos los tampones utilizados tienen que ser estériles y tienen que estar fríos antes de su uso. Conviene trabajar a partir de ahora a 4°C.

1. Preparar 25 µl de *dynabeads* por muestra en eppendorf de 2ml. Es muy importante tener en cuenta que para cada muestra, se realizará un control negativo con *dynabeads* pero sin incubar con el anticuerpo, con lo que es necesario preparar el doble de tubos con *dynabeads*. Este control es importante, pues nos determinará la unión inespecífica de los *dynabeads* al ADN.
2. Lavar las beads con el tampón de dilución del ChIP (**Tabla 29**) (x3). Para este paso no es necesario utilizar el tampón con los inhibidores de proteasas añadidos.
3. Diluir el anticuerpo en el tampón de dilución del ChIP. En nuestro caso, para el anticuerpo α-GFP que hemos utilizado, se ha realizado una dilución 1:1000 (20 ng

anticuerpo/ ml) en un volumen total de 100 μ l por muestra. Recordar, incubar con tampón sin anticuerpo los controles negativos. Para este paso no es necesario utilizar el tampón con los inhibidores de proteasas añadidos.

4. Incubar toda la noche a 4°C.

Tampón de dilución del ChIP	
Triton X-100	1.1%
EDTA	1.2 mM
Tris-HCl pH 8	16.7 mM
NaCl	167 mM
PMSF	0.1mM
<i>Protease inhibitor cocktail (Sigma)</i>	20 μ g/ml

Tabla 29. Composición del tampón de dilución del ChIP

10.3 Extracción de la muestra vegetal

Todos los tampones utilizados tienen que ser estériles y el β -mercaptoetanol y los inhibidores de proteasas tienen que añadirse en el momento de su utilización. Todos los tampones tienen que estar fríos antes de su uso. Conviene trabajar a partir de ahora a 4°C.

1. Añadir por cada 5ml de muestra pulverizada 30 ml del tampón de extracción 1 (**Tabla 24**) sin esperar a que se descongele la muestra. Mediante inversión homogeneizar la muestra y esperar 5 min en hielo.
2. Filtrar la solución por miracloth (x2) a un nuevo falcon de 50 ml.
3. Centrifugar a 4000 r.p.m a 4°C durante 20 minutos.
4. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1ml de tampón de extracción 2 (**Tabla 24**). Transferir la solución a un eppendorf de 1.5 ml.
5. Centrifugar a 12.000 g durante 10 min a 4°C.
6. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 300 μ l de tampón de extracción 3 (**Tabla 24**)
7. En un nuevo eppendorf añadir 300 μ l de tampón de extracción 3 y poco a poco hacer caer con la pipeta el pellet resuspendido del paso 6 sobre él con tal de hacer un gradiente. De esta forma tendremos un volumen final de 600 μ l.
8. Centrifugar durante 1h a máxima velocidad. Y preparar el tampón de lisis nuclear (**Tabla 24**). Reservar a temperatura ambiente, ya que este tampón precipita en frío.
9. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet con suavemente con ayuda de la pipeta en 300 μ l de tampón de lisis nuclear (en total junto con el volumen del pellet serán 350 μ l). Reservar una alícuota de 1 o 2 μ l para tenerla como control antes del sonicado.

10. Sonicar (30 sec x 6 veces). Reservar una alícuota de 1 o 2 µl para comprobar el sonificado mediante un gel de agarosa. A partir de aquí la cromatina se puede congelar a -20°C.
11. Alicuotar los 350 µl de cada muestra en 3 partes y colocarlas en un nuevo eppendorf. De esta forma tendremos tres eppendorfs por muestra con 100 µl cada uno rotulados como: Input, + anticuerpo y - anticuerpo.
12. Guardar el eppendorf perteneciente al Input a -20°C.
13. Realizar una dilución 1:10 en los eppendorf rotulados + anticuerpo y - anticuerpo con el tampón de dilución del CHIP (con los inhibidores de proteasas añadidos). De esta forma se diluirá el 1% SDS a 0.1% SDS.
14. Lavar los *dynabeads* (previamente incubados con o sin anticuerpo) con tampón de dilución del CHIP (x3)
15. Introducir los 1000 µl de cada eppendorf donde corresponda. Y incubar toda la noche a 4°C.

Tampón de extracción 1		Tampón de extracción 2		Tampón de extracción 3		Tampón de lisis nuclear	
Sucrosa	0.4M	Sucrosa	0.25 M	Sucrosa	1.7 M	Tris-HCl pH 8	50 mM
Tris-HCl pH 8	10 mM	Tris-HCl pH 8	10 mM	Tris-HCl pH 8	10 mM	SDS	1%
MgCl ₂	10 mM	MgCl ₂	10 mM	MgCl ₂	2 mM	EDTA	10mM
β-mercapto	5 mM	Triton X-100	1%	Triton X-100	0.15%		
		EDTA	1mM	EDTA	1mM		
		β-mercapto	5 mM	β-mercapto	5 mM		
PMSF	0.1 mM	PMSF	0.1 mM	PMSF	0.1 mM	PMSF	0.1 mM
Protease inhibitor cocktail (Sigma)	20 µg/ml	Protease inhibitor cocktail (Sigma)	20 µg/ml	Protease inhibitor cocktail (Sigma)	20 µg/ml	Protease inhibitor cocktail (Sigma)	20 µg/ml

Tabla 30. Tampones de extracción de la muestra vegetal para CHIP.

10.4 Lavados y elución del ADN

1. Preparar el tampón de elución (**Tabla 31**) y dejar a T^a ambiente. Precipita en frío. Los tampones para lavado tienen que estar en frío y ser estériles. No es necesario añadir inhibidores de proteasas a estos.
2. Unir los *dynabeads* al imán y lavar dos veces usando la secuencia de tampones descrita a continuación. Usar 1ml de cada uno por cada lavado y realizar los lavados a 4°C con agitación (preferiblemente utilizar una noria). Dejar que los *dynabeads* se unan entre lavado y lavado.
3. Lavar con el tampón de bajo contenido en sal (**Tabla 31**). (x2) 5min.

4. Lavar con el tampón de alto contenido de sal (**Tabla 31**). (x2) 5min.
5. Lavar con el tampón de lavado LiCl (**Tabla 31**). (x2) 5min.
6. Lavar con el tampón TE (10mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA) (x1) 5 min.
7. Eluir los inmunocomplejos añadiendo 250 µl de tampón de Elución. Mezclar por inversión y incubar a 65°C durante 15 min con agitación suave.
8. Dejar que las *dynabeads* se unan al imán y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo. Repetir el paso 7 y combinar los dos eluidos (Vf=500 µl).
9. Añadir 20 µl de NaCl 5M al eluido para revertir el *crosslink* a 65 °C durante toda la noche con agitación suave. Además descongelar las muestras de input, añadir tampón de elución hasta 500 µl, añadir 20 µl de NaCl 5M y poner a 65 °C durante toda la noche junto con el resto de muestras.

Tampón de Elución		Tampón de bajo contenido en sal		Tampón de alto contenido en sal		Tampón de lavado LiCl	
SDS	1%	NaCl	150 mM	NaCl	500 mM	LiCl	0.25 M
NaHCO ₃	0.1M	SDS	0.1 %	SDS	0.1 %	NP-40	1%
		Triton X-100	1%	Triton X-100	1%	Sodium deoxycholate	0.5 g
		EDTA	2 mM	EDTA	2 mM	EDTA	1mM
		Tris-HCl pH 8	20 mM	Tris-HCl pH 8	20 mM	Tris-HCl pH 8	10 mM

Tabla 31. Tampones para el lavado de los *dynabeads*

10.5 Recuperación del ADN

1. Añadir 10 µl de 0.5M EDTA, 20 µl Tris-HCl pH 6.5, y 2 µl de 10mg /ml proteinasa K al eluido y incubar a 45 °C durante 1h en agitación suave.
2. Recuperar el ADN. Añadir la misma cantidad de fenol/cloroformo, vortear y centrifugar durante 5 min. Transferir la parte superior a un nuevo tubo y añadir +26 µl Kac (2.5M), 2 volúmenes de etanol y 2 µl de glicógeno. Dejar a -20 °C durante al menos 2h. Es preferible toda la noche.
3. Centrifugar a 4 °C durante 30 minutos y después lavar los pellets con etanol 70% y dejar secar a temperatura ambiente. También se puede evaporar utilizando el speedvac programado a temperatura ambiente.
4. Resuspender los pellets con 50 µl de agua.

Para cada muestra, la PCR cuantitativa se realizó utilizando 2 µl DNA correspondiente al Input, 2µl DNA correspondiente a la muestra con anticuerpo (+AB) y 2 µl DNA correspondiente a la muestra sin anticuerpo (-AB) utilizando los oligonucleótidos cubriendo los sitios de unión de HY5 (**Tabla 6**). Posteriormente, con tal de normalizar cada una a su Input, se determinó el % input de la muestra +AB y de la muestra -AB. Finalmente se realizó el ratio del (% input muestra +AB)/ (% input muestra -AB). De

esta forma se normalizaron todas las muestras respecto a su imput y al control -, obteniendo su enriquecimiento.

11. Cuantificación de pigmentos

Para el protocolo de cuantificación de pigmentos mediante espectrofotometría o mediante HPLC es necesario mantener las muestras en frío y en oscuridad para preservar la estabilidad de los carotenoides y evitar procesos de fotooxidación. En función de la precisión requerida en la cuantificación de pigmentos se han utilizado dos métodos diferentes de cuantificación.

11.1 Espectrofotometría

1. Recoger 50mg de muestra vegetal en un eppendorf de 2ml y congelar en nitrógeno líquido. Pesar exactamente el contenido de cada muestra.
2. Pulverizar la muestra con Tissue Lyser manteniéndola congelada y añadir 250 µl de MeOH
3. 10 minutos en agitación a 4 °C
4. Añadir 300 µl de Tampón 1 (Tris-HCl 0.05M pH 7.5 NaCl 1M)
5. 10 minutos en agitación a 4 °C
6. Añadir 600 µl de cloroformo
7. 5 minutos en agitación a 4 °C
8. Centrifugar 5 minutos a 13000rpm a 4 °C
9. Extraer la parte organica (parte de abajo) y pasarla a otro eppendorf
10. Secar en el Speed Vac
11. Resuspender en 1000 µl de acetona
12. Medir la absorbancia de las muestras bajo las longitudes de onda de 663nm y 647 nm (clorofilas, Cl) y 472 nm (carotenoides, CRTs). En el caso de que los valores sean superiores a 0.8 querrá decir que hay una saturación en la cantidad de señal, con lo que será necesario diluir la muestra ½ con acetona con tal de tener una medida más fiable.

El contenido de pigmentos fotosintéticos se calculó a partir de las siguientes ecuaciones (Lichtenthaler, 1987). Los resultados obtenidos se representan en mg de clorofilas o carotenoides por mg de tejido fresco.

$$Cl_a = 12.25 A_{663} - 2.79 A_{647}$$

$$Cl_b = 21.50 A_{647} - 5.10 A_{663}$$

$$Cl_{a+b} = 7.15 A_{663} - 18.71 A_{647}$$

$$CRTs = (1000 A_{470} - 1.82 Cl_a - 85.02 Cl_b) / 198$$

11.2 HPLC- DAD

El protocolo utilizado está basado en el desarrollado por (Fraser et al., 2000)

1. Triturar la muestra vegetal en mortero con nitrógeno líquido hasta pulverizarla.
2. Liofilizar el material vigilando que no se descongele y aplicando un vacío de 0.01 atm durante toda la noche.

En nuestro caso hemos partido por una parte de material liofilizado proveniente de material vegetal verde y también proveniente de plantas albinas debido al tratamiento con inhibidores. En el primer caso, hemos partido de 4mg de material liofilizado y en el segundo de 8 mg y en ambos casos se ha apuntado exactamente el peso para tenerlo en cuenta para cálculos posteriores.

Para calcular la eficiencia de la extracción se añadió a todas las muestras una cantidad equivalente del carotenoide cantaxantina (Fluka) que no se produce en las plantas y se utiliza como patrón interno. El contenido de carotenoides en las plántulas albinas es mucho más pequeño que el de los tejidos fotosintéticos por tanto la cantidad de cantaxantina añadida, que debe estar a una concentración del orden de la cantidad de carotenoides a analizar, fue diferente. Se preparó una disolución de una concentración de 0.12 mg/mL (1.2 mg de cantaxantina en 10 mL de CHCl_3) y se añadieron 50 μL a las muestras de tejido fotosintético (6 μg de cantaxantina) y 50 μL de una dilución 1:200 de la solución anterior al material albino (0.03 μg de cantaxantina). La extracción se realizó según el siguiente protocolo:

3. Pesar 4 mg de material liofilizado verde o 8 mg de material albino.
4. Añadir 400 μL de metanol y cantaxantina (350 mL metanol y 50 mL de la disolución de cantaxantina a la concentración pertinente mezclados previamente).
5. Mezclar con agitación vigorosa durante 10 min.
6. Añadir 400 μL de una solución Tris-HCl 50 mM pH 7.5 NaCl 1M.
7. Mezclar con agitación vigorosa durante 10 min.
8. Añadir 400 μL de CHCl_3 .
9. Mezclar con agitación vigorosa durante 10 min.
10. Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 5 min.
11. Recuperar el volumen de la fase orgánica (donde se extrajeron los carotenoides y las clorofilas), que por la densidad del cloroformo queda en la parte inferior, evitando la interfase.
12. Evaporar hasta sequedad el disolvente en un "Speed Vac".
13. Resuspender el residuo seco en un volumen de 200 μL (tejido verde) o 100 μL (tejido albino o de raíz) de acetato de etilo (AcEt). Se puede vortear la muestra para asegurarnos de que todo quede disuelto en el disolvente.
14. Filtrar la solución y pasarla a los viales de HPLC. De la misma manera que para las muestras, preparar varios viales con 50 μL de cantaxantina en 100 o 200 μL de AcEt. El método de HPLC se describe en (Rodríguez-Concepción et al., 2004). El contenido de

cada carotenoide (CRT) o clorofila se calculó según las siguientes ecuaciones y se indican en ng de analito entre mg de tejido liofilizado.

$$ng\ CRT = \frac{\frac{\text{área pico CRT}}{14.47} \times \text{Vacetato etilo}}{\frac{\text{área pico cantaxantina (muestra)}}{\text{área pico cantaxantina (patrón)}}}$$

$$ng\ clorofila = \frac{\frac{\text{área pico clorofila}}{9.031} \times \text{Vacetato etilo}}{\frac{\text{área pico cantaxantina (muestra)}}{\text{área pico cantaxantina (patrón)}}}$$

11.3 Determinación de niveles de clorofila “in vivo”

En el caso de muestras donde por cuestiones técnicas ni podíamos obtener material suficiente como para realizar la extracción de pigmentos convencional, se optó por tener una aproximación de los niveles de pigmentos teniendo en cuenta la autofluorescencia de la clorofila mediante microscopía confocal.

Para ello, se realizaron al menos fotografías de la zona abaxial de los cotiledones de al menos 8 plantas diferentes por cada tratamiento. Las fotografías se realizaron a la misma distancia, intensidad del laser y con el mismo zoom. La autofluorescencia de la clorofila se detectó con un filtro LP590 tras la excitación con luz verde a 568 nm. De forma que mediante el programa Fluoview propio del equipo de Olympus pudimos seleccionar la misma ROI y determinar el ruido de fondo a eliminar, siempre el mismo en todas las fotografías. De esta forma, el programa indica la intensidad total de cada fotografía y se puede determinar la concentración relativa de clorofila de una muestra respecto a otra.

12. Imagen y Microscopía

12.1 Lupa

Para examinar de forma rápida las líneas transgénicas generadas tanto 35S:HY5-GFP como 35S:PhyB-GFP se utilizó la lupa binocular de fluorescencia Leica DC250 al máximo aumento con el filtro que permite visualizar la proteína GFP.

12.1 Microscopía laser confocal

Para todas las muestras de microscopía mostradas en la tesis, la preparación de la muestra se hizo a partir de plántulas enteras crecidas durante 7 días. El montaje de la muestra se realizó depositando una plántula en el portaobjetos junto con una gota de agua y después presionando ligeramente con el cubreobjetos.

Parte de las fotografías presentadas en esta tesis se realizaron con el microscopio Olympus FLUOVIEW FV1000, en concreto las de la construcción 35S:*PhyB-GFP* en presencia o ausencia de ABA. Las muestras se observaron con un objetivo de 60X compatible con agua. La autofluorescencia de la clorofila se detectó con un filtro LP590 tras la excitación con luz verde a 568 nm y la señal de la GFP se determinó a partir de la excitación con 488 nm usando una ventana de emisión de 495 a 535 nm.

En el caso de la visualización de la inactivación del *phyB-GFP* en la construcción 35S:*phyB-GFP* y 35S:*phyB-GFP* [*hy5-2*] a lo largo del tiempo utilizamos el equipo Olympus BX60 FLUOVIEW FV300 del laboratorio de Akira Nagatani, con un laser de excitación de argón de 488 nm. Visualizamos primero las muestras en luz W y se realizaron fotografías de la parte superior del hipocotilo. A continuación se sometieron a un pulso de FR (735 nm con una intensidad de 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) durante 5 min y se mantuvieron en oscuridad. Para realizar fotografías totalmente en oscuridad se enfocó la parte superior del hipocotilo mediante un filtro verde (con tal de no fotoactivar el *phyB* con la luz de transmisión) y se programó el microscopio para realizar 3 imágenes secuenciales de diferentes planos focales en total oscuridad (con tal de no fotoactivar el *phyB*). Una vez la muestra era fotografiada una vez, no se podía fotografiar de nuevo, debido a que el laser del microscopio inducía la fotoactivación del *phyB*.

12.3 . Fotografía

Se utilizó la cámara Nikon D7000 acoplada a los objetivos AF-S NIKKON 18-70 mm 1:3.5- 4.5G y AF-S MICRO NIKKON 105 mm 1:2.8G para fotografiar y mostrar el fenotipo de todas las líneas de *Arabidopsis* estudiadas en esta tesis, así como para la posterior medida de la longitud del hipocotilo mediante el programa ImageJ.

Bibliografía

Bibliografía

- Ádám, É., Hussong, A., Bindics, J., Wüst, F., Viczián, A., Essing, M., Medzihradsky, M., Kircher, S., Schäfer, E. and Nagy, F. (2011) 'Altered dark- and photoconversion of phytochrome B mediate extreme light sensitivity and loss of photoreversibility of the phyB-401 mutant', *PLoS ONE*, 6(11). doi: 10.1371/journal.pone.0027250.
- Águila Ruiz-Sola, M., Victoria Barja, M., Manzano, D., Llorente, B., Schipper, B., Beekwilder, J. and Rodríguez-Concepción, M. (2016) 'A Single Arabidopsis Gene Encodes Two Differentially Targeted Geranylgeranyl Diphosphate Synthase Isoforms 1', 172(November), pp. 1393–1402. doi: 10.1104/pp.16.01392.
- Alonso, J. M. (2003) 'Genome-Wide Insertional Mutagenesis of Arabidopsis thaliana', *Science*, 301(5633), pp. 653–657. doi: 10.1126/science.1086391.
- Ang, L. H., Chattopadhyay, S., Wei, N., Oyama, T., Okada, K., Batschauer, A. and Deng, X. W. (1998) 'Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of Arabidopsis development.', *Molecular cell*, 1(2), pp. 213–222. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80022-2.
- Ankele, E., Kindgren, P., Pesquet, E. and Strand, A. (2007) 'In vivo visualization of Mg-protoporphyrin IX, a coordinator of photosynthetic gene expression in the nucleus and the chloroplast.', *The Plant cell*, 19(6), pp. 1964–79. doi: 10.1105/tpc.106.048744.
- Arch, È., Wang, Z., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S. and Chory, J. (2001) 'BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids', *Letters to Nature*, 410(MARCH), pp. 380–383.
- Auldridge, M. E., McCarty, D. R. and Klee, H. J. (2006) 'Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products', *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3), pp. 315–321. doi: 10.1016/j.pbi.2006.03.005.
- Avendaño-Vázquez, A.-O., Córdoba, E., Llamas, E., San Román, C., Nisar, N., De la Torre, S., Ramos-Vega, M., Gutiérrez-Nava, M. D. L. L., Cazzonelli, C. I., Pogson, B. J. and León, P. (2014) 'An Uncharacterized Apocarotenoid-Derived Signal Generated in ζ -Carotene Desaturase Mutants Regulates Leaf Development and the Expression of Chloroplast and Nuclear Genes in Arabidopsis.', *The Plant cell*, 26(June), pp. 2524–2537. doi: 10.1105/tpc.114.123349.
- Bae Gabyong and Choi, G. (2008) 'Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins.', *Annual review of plant biology*, 59, pp. 281–311. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092859.
- Baier, M. and Dietz, K. J. (2005) 'Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: A discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology', *Journal of Experimental Botany*, 56(416), pp. 1449–1462. doi: 10.1093/jxb/eri161.

- Ballaré, Sánchez, Scoppel, Casal and Ghera (1987) 'Early detection of neighbour plants by phytochrome perception of spectral changes in reflected sunlight', *Plant, Cell & Environment*, 10(7), pp. 551–557. doi: 10.1111/1365-3040.ep11604091.
- Bechtold, U., Richard, O., Zamboni, A., Gapper, C., Geisler, M., Pogson, B., Karpinski, S. and Mullineaux, P. M. (2008) 'Impact of chloroplastic- and extracellular-sourced ROS on high light-responsive gene expression in *Arabidopsis*', *Journal of Experimental Botany*, 59(2), pp. 121–133. doi: 10.1093/jxb/erm289.
- Benn, G., Bjornson, M., Ke, H., De Souza, A., Balmond, E. I., Shaw, J. T. and Dehesh, K. (2016) 'Plastidial metabolite MECP induces a transcriptionally centered stress-response hub via the transcription factor CAMTA3 - supplement', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 16(2003), p. 201602582. doi: 10.1073/pnas.1602582113.
- Bonfils, M. H. J., Lu, C. and Niyogi, K. K. (2000) 'Photodamage of the Photosynthetic Apparatus and Its Dependence on the Leaf Developmental Stage in the', *Society*, 124(September), pp. 273–284. doi: 10.1104/pp.124.1.273.
- Booker, J., Sieberer, T., Wright, W., Williamson, L., Willett, B., Stirnberg, P., Turnbull, C., Srinivasan, M., Goddard, P. and Leyser, O. (2005) 'MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone', *Developmental Cell*, 8(3), pp. 443–449. doi: 10.1016/j.devcel.2005.01.009.
- Botto, J. F. and Smith, H. (2002) 'Differential genetic variation in adaptive strategies to a common environmental signal in *Arabidopsis* accessions: Phytochrome-mediated shade avoidance', *Plant, Cell and Environment*, 25(1), pp. 53–63. doi: 10.1046/j.0016-8025.2001.00812.x.
- Bou-Torrent, J., Roig-Villanova, I., Anahit, G. and Martinez-Garcia, J. F. (2008) 'PAR1 and PAR2 integrate shade and hormone transcriptional networks and es io s ci en ce', *Plant signaling & behavior*, 3(July), pp. 453–454. doi: 10.1038/sj.emboj.7601890. www.landesbioscience.com.
- Bou-Torrent, J., Toledo-Ortiz, G., Ortiz-Alcaide, M., Cifuentes-Esquivel, N., Halliday, K. J., Martinez-García, J. F. and Rodríguez-Concepción, M. (2015) 'Regulation of carotenoid biosynthesis by shade relies on specific subsets of antagonistic transcription factors and co-factors', *Plant Physiology*, 168(November), p. 00552.2015. doi: DOI:10.1104/pp.15.00552.
- Brautigam, K., Dietzel, L., Kleine, T., Stroher, E., Wormuth, D., Dietz, K.-J., Radke, D., Wirtz, M., Hell, R., Dormann, P., Nunes-Nesi, A., Schauer, N., Fernie, A. R., Oliver, S. N., Geigenberger, P., Leister, D. and Pfannschmidt, T. (2009) 'Dynamic Plastid Redox Signals Integrate Gene Expression and Metabolism to Induce Distinct Metabolic States in Photosynthetic Acclimation in *Arabidopsis*', *The Plant Cell Online*, 21(9), pp. 2715–2732. doi: 10.1105/tpc.108.062018.
- Bräutigam, K., Dietzel, L. and Pfannschmidt, T. (2007) 'Plastid-nucleus communication: anterograde and retrograde signalling in the development and function of plastids', *Topics in Current Genetics*, 19(6 July 2007), pp. 409–455. doi: 10.1007/4735.

- Breitenbach, J., Zhu, C. and Sandmann, G. (2001) 'Bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), pp. 5270–5272. doi: 10.1021/jf0106751.
- Britton, G. (1993) 'Carotenoids in chloroplast pigment-protein complexes. In Pigment protein complexes in plastids: Synthesis and assembly' (Cell biology: A series of monographs), C. Sundqvist and M. Ryberg, eds (Academic Press: San Diego), pp. 447–483.
- Van Buskirk, E. K., Reddy, A. K., Nagatani, A. and Chen, M. (2014) 'Photobody Localization of Phytochrome B Is Tightly Correlated with Prolonged and Light-Dependent Inhibition of Hypocotyl Elongation in the Dark.', *Plant physiology*, 165(2), pp. 595–607. doi: 10.1104/pp.114.236661.
- Cagnola, J. I., Ploschuk, E., Benech-Arnold, T., Finlayson, S. a and Casal, J. J. (2012) 'Stem transcriptome reveals mechanisms to reduce the energetic cost of shade-avoidance responses in tomato.', *Plant physiology*, 160(2), pp. 1110–9. doi: 10.1104/pp.112.201921.
- Carabelli, M., Possenti, M., Sessa, G., Ciolfi, A., Sassi, M., Morelli, G. and Ruberti, I. (2007) 'Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity service Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity', *Genes & Development*, pp. 1863–1868. doi: 10.1101/gad.432607.
- Carretero-Paulet, L., Galstyan, A., Roig-Villanova, I., Martínez-García, J. F., Bilbao-Castro, J. R. and Robertson, D. L. (2010) 'Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in Arabidopsis, poplar, rice, moss, and algae.', *Plant physiology*, 153(3), pp. 1398–412. doi: 10.1104/pp.110.153593.
- Casal, J. J. (2013) 'Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade.', *Annual review of plant biology*, 64(January), pp. 403–27. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120221.
- Castillon, A., Shen, H. and Huq, E. (2007) 'Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks', *Trends in Plant Science*, pp. 514–521. doi: 10.1016/j.tplants.2007.10.001.
- Chan, K. X., Phua, S. Y., Crisp, P., Mcquinn, R. and Pogson, B. J. (2016) 'Learning the Languages of the Chloroplast: Retrograde Signaling and Beyond', (November 2015), pp. 1–29. doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-111854.
- Chappell, J. (2002) 'The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami', *Current Opinion in Plant Biology*, pp. 151–157. doi: 10.1016/S1369-5266(02)00241-8.
- Chen, D., Xu, G., Tang, W., Jing, Y., Ji, Q., Fei, Z. and Lin, R. (2013) 'Antagonistic Basic Helix-Loop-Helix/bZIP Transcription Factors Form Transcriptional Modules That Integrate Light and Reactive Oxygen Species Signaling in Arabidopsis', *The Plant Cell*, 25(5), pp. 1657–1673. doi: 10.1105/tpc.112.104869.

- Chen, H., Zhang, J., Neff, M. M., Hong, S.-W., Zhang, H., Deng, X.-W. and Xiong, L. (2008) 'Integration of light and abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(11), pp. 4495–4500. doi: 10.1073/pnas.0710778105.
- Chen, M. and Chory, J. (2011) 'Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development', *Trends in Cell Biology*, pp. 664–671. doi: 10.1016/j.tcb.2011.07.002.
- Chen, M., Schwab, R. and Chory, J. (2003) 'Characterization of the requirements for localization of phytochrome B to nuclear bodies.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), pp. 14493–8. doi: 10.1073/pnas.1935989100.
- Cheng, W.-H., Endo, A. and Zhou, L. (2002) 'A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signalling and abscisic acid biosynthesis and functions', *Plant Cell*, 14(November), pp. 2723–2743. doi: 10.1105/tpc.006494.2.
- Cifuentes-Esquivel, N., Bou-Torrent, J., Galstyan, A., Gallemí, M., Sessa, G., Salla Martret, M., Roig-Villanova, I., Ruberti, I. and Martínez-García, J. F. (2013) 'The bHLH proteins BEE and BIM positively modulate the shade avoidance syndrome in *Arabidopsis* seedlings', *Plant Journal*, 75(6), pp. 989–1002. doi: 10.1111/tpj.12264.
- Ciolfi, A., Sessa, G., Sassi, M., Possenti, M., Salvucci, S., Carabelli, M., Morelli, G. and Ruberti, I. (2013) 'Dynamics of the shade-avoidance response in *Arabidopsis*', *Plant physiology*, 163(1), pp. 331–53. doi: 10.1104/pp.113.221549.
- Clough, S. J. and Bent, A. F. (1998) 'Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*.', *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 16(6), pp. 735–43.
- Clouse, S. D., Langford, M. and Mcmorris, T. C. (1996) 'A Brassinosteroid-Insensitive Mutant in *Arabidopsis thaliana* Exhibits Multiple Defects in Growth and Development', *Plant Physiol*, 11(1), pp. 671–678. doi: 10.1104/pp.111.3.671.
- Cluis, C. P., Mouchel, C. F. and Hardtke, C. S. (2004) 'The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways', *Plant Journal*, 38(2), pp. 332–347. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02052.x.
- Colombo, M., Tadini, L., Peracchio, C., Ferrari, R. and Pesaresi, P. (2016) 'GUN1, a Jack-Of-All-Trades in Chloroplast Protein Homeostasis and Signaling', *Frontiers in Plant Science*, 7(September). doi: 10.3389/fpls.2016.01427.
- Croteau, R., Kutchan, T. M. and Lewis, N. G. (2000) 'Secondary Metabolites', *Biochemistry Molecular Biology of Plants*, 7(7), pp. 1250–1318. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.10.011.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K. and Scheible, W.-R. (2005) 'Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*.', *Plant physiology*, 139(1), pp. 5–17. doi: 10.1104/pp.105.063743.

- Das, D., St Onge, K. R., Voeseinek, L. A. C. J., Pierik, R. and Sasidharan, R. (2016) 'Ethylene- and shade-induced hypocotyl elongation share transcriptome patterns and functional regulators', *Plant Physiology*, (October), p. pp.00725.2016. doi: 10.1104/pp.16.00725.
- Delker, C., Sonntag, L., James, G., Janitza, P., Ibañez, C., Ziermann, H., Peterson, T., Denk, K., Mull, S., Ziegler, J., Davis, S., Schneeberger, K. and Quint, M. (2014) 'The DET1-COP1-HY5 Pathway Constitutes a Multipurpose Signaling Module Regulating Plant Photomorphogenesis and Thermomorphogenesis', *Cell Reports*, 9(6), pp. 1983–1989. doi: 10.1016/j.celrep.2014.11.043.
- Dietz, K. J. (2015) 'Efficient high light acclimation involves rapid processes at multiple mechanistic levels', *Journal of Experimental Botany*, 66(9), pp. 2401–2414. doi: 10.1093/jxb/eru505.
- Dudareva, N., Andersson, S., Orlova, I., Gatto, N., Reichelt, M., Rhodes, D., Boland, W. and Gershenzon, J. (2005) 'The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(3), pp. 933–938. doi: 10.1073/pnas.0407360102.
- Eggers, L. F. and Schwudke, D. (2016) 'Encyclopedia of Lipidomics', pp. 2007–2009. doi: 10.1007/978-94-007-7864-1.
- Escalante-Pérez, M., Krol, E., Stange, A., Geiger, D., Al-Rasheid, K. a S., Hause, B., Neher, E. and Hedrich, R. (2011) 'A special pair of phytohormones controls excitability, slow closure, and external stomach formation in the Venus flytrap.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(37), pp. 15492–15497. doi: 10.1073/pnas.1112535108.
- Estavillo, G. M., Crisp, P. A., Pornsiriwong, W., Wirtz, M., Collinge, D., Carrie, C., Giraud, E., Whelan, J., David, P., Javot, H., Brearley, C., Hell, R., Marin, E. and Pogson, B. J. (2011) 'Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and high light signaling in Arabidopsis.', *The Plant cell*, 23(11), pp. 3992–4012. doi: 10.1105/tpc.111.091033.
- Folta, K. M. and Childers, K. S. (2008) 'Light as a Growth Regulator: Controlling Plant Biology with Narrow-bandwidth Solid-state Lighting Systems', *Hortscience*, 43(June), pp. 1957–1964.
- Franklin, K. A. (2008) 'Shade avoidance', *New Phytologist*, 179(4), pp. 930–944. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02507.x.
- Franklin, K. A. and Quail, P. H. (2010) 'Phytochrome functions in Arabidopsis development', *Journal of Experimental Botany*, 61(1), pp. 11–24. doi: 10.1093/jxb/erp304.
- Franklin, K. a and Whitelam, G. C. (2007) 'Light-quality regulation of freezing tolerance in Arabidopsis thaliana.', *Nature Genetics*, 39(11), pp. 1410–3. doi: 10.1038/ng.2007.3.

- Fraser, P. D. and Bramley, P. M. (2004) 'The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids', *Progress in Lipid Research*, 43(3), pp. 228–265. doi: 10.1016/j.plipres.2003.10.002.
- Fraser, P. D., Romer, S., Shipton, C. A., Mills, P. B., Kiano, J. W., Misawa, N., Drake, R. G., Schuch, W. and Bramley, P. M. (2002) 'Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), pp. 1092–7. doi: 10.1073/pnas.241374598.
- Galpaz, N., Ronen, G., Khalfa, Z., Zamir, D. and Hirschberg, J. (2006) 'A Chromoplast-specific carotenoid Biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato white-flower locus', *Plant Cell*, 18(8), pp. 1947–60. doi: 10.1105/tpc.105.039966.2.
- Galstyan, A., Bou-Torrent, J., Roig-Villanova, I. and Martínez-García, J. F. (2012) 'A dual mechanism controls nuclear localization in the atypical basic-helix-loop-helix protein PAR1 of *Arabidopsis thaliana*', *Molecular Plant*, 5(3), pp. 669–677. doi: 10.1093/mp/sss006.
- Galstyan, A., Cifuentes-Esquivel, N., Bou-Torrent, J. and Martinez-Garcia, J. F. (2011) 'The shade avoidance syndrome in *Arabidopsis*: A fundamental role for atypical basic helix-loop-helix proteins as transcriptional cofactors', *Plant Journal*, 66(2), pp. 258–267. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04485.x.
- Galvez-Valdivieso, G., Fryer, M. J., Lawson, T., Slattery, K., Truman, W., Smirnov, N., Asami, T., Davies, W. J., Jones, A. M., Baker, N. R. and Mullineaux, P. M. (2009) 'The high light response in *Arabidopsis* involves ABA signaling between vascular and bundle sheath cells', *The Plant cell*, 21(7), pp. 2143–62. doi: 10.1105/tpc.108.061507.
- Gil, M. J., Coego, A., Mauch-Mani, B., Jordá, L. and Vera, P. (2005) 'The *Arabidopsis* *csb3* mutant reveals a regulatory link between salicylic acid-mediated disease resistance and the methyl-erythritol 4-phosphate pathway', *Plant Journal*, 44(1), pp. 155–166. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02517.x.
- Goda, H., Sawa, S., Asami, T., Fujioka, S., Shimada, Y. and Yoshida, S. (2004) 'Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*', *Plant physiology*, 134(4), pp. 1555–73. doi: 10.1104/pp.103.034736.
- González-Cabanelas, D., Wright, L. P., Paetz, C., Onkokesung, N., Gershenzon, J., Rodríguez-Concepción, M. and Phillips, M. a. (2015) 'The diversion of 2-C-methyl-d-erythritol-2,4-cyclodiphosphate from the 2-C-methyl-d-erythritol 4-phosphate pathway to hemiterpene glycosides mediates stress responses in *Arabidopsis thaliana*', *Plant Journal*, 82(1), pp. 122–137. doi: 10.1111/tpj.12798.
- Green, B. R. (2011) 'Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes', *Plant Journal*, 66(1), pp. 34–44. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04541.x.
- Hao, Y., Oh, E., Choi, G., Liang, Z. and Wang, Z. Y. (2012) 'Interactions between HLH and bHLH factors modulate light-regulated plant development', *Molecular Plant*. © The Authors. All rights reserved., 5(3), pp. 688–697. doi: 10.1093/mp/sss011.

- Hardtke, C. S., Gohda, K., Osterlund, M. T., Oyama, T., Okada, K. and Deng, X. W. (2000) 'HY5 stability and activity in arabidopsis is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain.', *The EMBO journal*, 19(18), pp. 4997–5006. doi: 10.1093/emboj/19.18.4997.
- Havaux, M. (2014) 'Carotenoid oxidation products as stress signals in plants', *Plant Journal*, 79(4), pp. 597–606. doi: 10.1111/tpj.12386.
- Heim, M. a., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B. and Bailey, P. C. (2003) 'The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity', *Molecular Biology and Evolution*, 20(5), pp. 735–747. doi: 10.1093/molbev/msg088.
- Hieber, A. D., Bugos, R. C. and Yamamoto, H. Y. (2000) 'Plant lipocalins: Violaxanthin de-epoxidase and zeaxanthin epoxidase', *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482(1–2), pp. 84–91. doi: 10.1016/S0167-4838(00)00141-2.
- Hiltscher, H., Rudnik, R., Shaikhali, J., Heiber, I., Mellenthin, M., Meirelles Duarte, I., Schuster, G., Kahmann, U. and Baier, M. (2014) 'The radical induced cell death protein 1 (RCD1) supports transcriptional activation of genes for chloroplast antioxidant enzymes', *Frontiers in plant science*, 5(September), p. 475. doi: 10.3389/fpls.2014.00475.
- Holmes, M. G. and Smith, H. (1977) 'The function of phytochrome in the natural environment. 2. Influence of vegetation canopies on spectral energy-distribution of natural daylight', *Photochemistry and Photobiology*, 25(6), pp. 539–545.
- Hornitschek, P., Kohnen, M. V., Lorrain, S., Rougemont, J., Ljung, K., López-Vidriero, I., Franco-Zorrilla, J. M., Solano, R., Trevisan, M., Pradervand, S., Xenarios, I. and Fankhauser, C. (2012) 'Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling', *Plant Journal*, 71(5), pp. 699–711. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.05033.x.
- Hornitschek, P., Lorrain, S., Zoete, V., Michielin, O. and Fankhauser, C. (2009) 'Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers', *The EMBO journal*, 28(24), pp. 3893–3902. doi: 10.1038/emboj.2009.306.
- Hou, X., Rivers, J., León, P., McQuinn, R. P. and Pogson, B. J. (2016) 'Synthesis and Function of Apocarotenoid Signals in Plants', *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd, 21(9), pp. 792–803. doi: 10.1016/j.tplants.2016.06.001.
- Hsieh, M. H. and Goodman, H. M. (2005) 'The Arabidopsis IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis', *Plant Physiol*, 138(2), pp. 641–653. doi: 10.1104/pp.104.058735.
- Isaacson, T., Ronen, G., Zamir, D. and Hirschberg, J. (2002) 'Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants', *The Plant Cell*, 14(February), pp. 333–42. doi: 10.1105/tpc.010303.2001.

- Jia, K. P., Luo, Q., He, S. B., Lu, X. D. and Yang, H. Q. (2014) 'Strigolactone-regulated hypocotyl elongation is dependent on cryptochrome and phytochrome signaling pathways in *Arabidopsis*', *Molecular Plant*, 7(3), pp. 528–540. doi: 10.1093/mp/sst093.
- Johansson, H., Jones, H. J., Foreman, J., Hemsted, J. R., Stewart, K., Grima, R. and Halliday, K. J. (2014) 'Arabidopsis cell expansion is controlled by a photothermal switch', *Nature communications*. Nature Publishing Group, 5, p. 4848. doi: 10.1038/ncomms5848.
- Jung, H.-S., Crisp, P. A., Estavillo, G. M., Cole, B., Hong, F., Mockler, T. C., Pogson, B. J. and Chory, J. (2013) 'Subset of heat-shock transcription factors required for the early response of *Arabidopsis* to excess light', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(35), pp. 14474–9. doi: 10.1073/pnas.1311632110.
- Jüttner, F., Watson, S. B., von Elert, E. and Köster, O. (2010) 'β-Cyclocitral, a Grazer Defence Signal Unique to the Cyanobacterium *Microcystis*', *Journal of Chemical Ecology*, 36(12), pp. 1387–1397. doi: 10.1007/s10886-010-9877-0.
- Kachanovsky, D. E., Filler, S., Isaacson, T. and Hirschberg, J. (2012) 'Epistasis in tomato color mutations involves regulation of phytoene synthase 1 expression by cis-carotenoids', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(46), pp. 19021–6. doi: 10.1073/pnas.1214808109.
- Kakizaki, T., Matsumura, H., Nakayama, K., Che, F.-S., Terauchi, R. and Inaba, T. (2009) 'Coordination of plastid protein import and nuclear gene expression by plastid-to-nucleus retrograde signaling', *Plant physiology*, 151(3), pp. 1339–1353. doi: 10.1104/pp.109.145987.
- Kakizaki, T., Yazu, F., Nakayama, K., Ito-Inaba, Y. and Inaba, T. (2012) 'Plastid signalling under multiple conditions is accompanied by a common defect in RNA editing in plastids', *Journal of Experimental Botany*, 63(1), pp. 251–260. doi: 10.1093/jxb/err257.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P. and Fankhauser, C. (2010) 'Light-regulated plant growth and development', *Current Topics in Developmental Biology*, 91(C), pp. 29–66. doi: 10.1016/S0070-2153(10)91002-8.
- Kim, C., Meskauskienė, R., Apel, K. and Laloi, C. (2008) 'No single way to understand singlet oxygen signalling in plants', *EMBO reports*, 9(5), pp. 435–439. doi: 10.1038/embor.2008.57.
- Kim, J. and DellaPenna, D. (2006) 'Defining the primary route for lutein synthesis in plants: the role of *Arabidopsis* carotenoid beta-ring hydroxylase CYP97A3', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(9), pp. 3474–9. doi: 10.1073/pnas.0511207103.
- Kindgren, P., Kremnev, D., Blanco, N. E., De Dios Barajas López, J., Fernández, A. P., Tellgren-Roth, C., Small, I. and Strand, Å. (2012a) 'The plastid redox insensitive 2 mutant of *Arabidopsis* is impaired in PEP activity and high light-dependent plastid redox signalling to the nucleus', *Plant Journal*, 70(2), pp. 279–291. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2011.04865.x.

- Kindgren, P., Norén, L., Barajas López, J. D. D., Shaikhali, J. and Strand, Å. (2012b) 'Interplay between HEAT SHOCK PROTEIN 90 and HY5 controls PhANG expression in response to the GUN5 plastid signal', *Molecular Plant*, 5(4), pp. 901–913. doi: 10.1093/mp/ssr112.
- Kircher, S., Gil, P., Kozma-Bognár, L., Fejes, E., Speth, V., Husselstein-Muller, T., Bauer, D., Adám, E., Schäfer, E. and Nagy, F. (2002) 'Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm', *The Plant cell*, 14(7), pp. 1541–55. doi: 10.1105/tpc.001156.
- Kleine, T. and Leister, D. (2016) 'Retrograde signaling: Organelles go networking', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. Elsevier B.V., pp. 1–13. doi: 10.1016/j.bbabi.2016.03.017.
- Kleine, T., Leister, D. and Lmu, L. M. (2013) 'Retrograde signals galore', *Frontiers in Plant Science*, 4(March), p. 45. doi: 10.3389/fpls.2013.00045.
- Kline, K. G., Barrett-Wilt, G. A. and Sussman, M. R. (2010) 'In planta changes in protein phosphorylation induced by the plant hormone abscisic acid', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107(36), pp. 15986–15991. doi: 10.1073/pnas.1007879107.
- Kochevar, I. E. (2004) 'Singlet oxygen signaling: from intimate to global', *Sci STKE*, 2004(221), p. pe7. doi: 10.1126/stke.2212004pe7.
- Koussevitzky, S., Nott, A., C. Mockler, T., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R. and Chory, J. (2007) 'Signals from Chloroplasts Converge to Regulate Nuclear Gene Expression', *Science*, 316(May), pp. 715–718. doi: 10.1126/science.
- Krieger-Liszkay, A. (2005) 'Singlet oxygen production in photosynthesis', *Journal of Experimental Botany*, 56(411), pp. 337–346. doi: 10.1093/jxb/erh237.
- Larkin, R. (2014) 'Influence of plastids on light signalling and development', *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 369: 20130232. doi: 10.1098/rstb.2013.0232.
- Larkin, R. M. (2016) 'Tetrapyrrole Signaling in Plants', *Frontiers in Plant Science*, 7(October), pp. 1–17. doi: 10.3389/fpls.2016.01586.
- Larkin, R. M. and Ruckle, M. E. (2008) 'Integration of light and plastid signals', *Current Opinion in Plant Biology*, 11(6), pp. 593–599. doi: 10.1016/j.pbi.2008.10.004.
- Lau, O. S. and Deng, X. W. (2010) 'Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones', *Current Opinion in Plant Biology*, pp. 571–577. doi: 10.1016/j.pbi.2010.07.001.
- Lee, J., He, K., Stolc, V., Lee, H., Figueroa, P., Gao, Y., Tongprasit, W., Zhao, H., Lee, I. and Deng, X. W. (2007) 'Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development', *The Plant cell*, 19(3), pp. 731–749. doi: 10.1105/tpc.106.047688.
- Leister, D. (2012) 'Retrograde signaling in plants: from simple to complex scenarios', *Frontiers in Plant Science*, 3(June), pp. 1–9. doi: 10.3389/fpls.2012.00135.

- Leivar, P., Monte, E., Oka, Y., Liu, T., Carle, C., Castillon, A., Huq, E. and Quail, P. H. (2008a) 'Multiple Phytochrome-Interacting bHLH Transcription Factors Repress Premature Seedling Photomorphogenesis in Darkness', *Current Biology*. Elsevier Ltd, 18(23), pp. 1815–1823. doi: 10.1016/j.cub.2008.10.058.
- Leivar, P., Monte, E., Al-Sady, B., Carle, C., Storer, A., Alonso, J. M., Ecker, J. R. and Quail, P. H. (2008b) 'The Arabidopsis phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels', *The Plant cell*, 20(2), pp. 337–352. doi: 10.1105/tpc.107.052142.
- Leivar, P. and Quail, P. H. (2011) 'PIFs: Pivotal components in a cellular signaling hub', *Trends in Plant Science*, 16(1), pp. 19–28. doi: 10.1016/j.tplants.2010.08.003.
- Leivar, P., Monte, E., Cohn, M. M. and Quail, P. H. (2012a) 'Phytochrome signaling in green Arabidopsis seedlings: Impact assessment of a mutually negative phyB-PIF feedback loop', *Molecular Plant*, 5(3), pp. 734–749. doi: 10.1093/mp/sss031.
- Leivar, P., Tepperman, J. M., Cohn, M. M., Monte, E., Al-Sady, B., Erickson, E. and Quail, P. H. (2012b) 'Dynamic Antagonism between Phytochromes and PIF Family Basic Helix-Loop-Helix Factors Induces Selective Reciprocal Responses to Light and Shade in a Rapidly Responsive Transcriptional Network in Arabidopsis', *The Plant Cell*, 24(4), pp. 1398–1419. doi: 10.1105/tpc.112.095711.
- Leivar, P., Tepperman, J. M., Monte, E., Calderon, R. H., Liu, T. L. and Quail, P. H. (2009) 'Definition of early transcriptional circuitry involved in light-induced reversal of PIF-imposed repression of photomorphogenesis in young Arabidopsis seedlings', *The Plant cell*, 21(11), pp. 3535–3553. doi: 10.1105/tpc.109.070672.
- Lemos, M., Xiao, Y., Bjornson, M., Wang, J. Z., Hicks, D., Souza, A. De, Wang, C. Q., Yang, P., Ma, S., Dinesh-Kumar, S. and Dehesh, K. (2016) 'The plastidial retrograde signal methyl erythritol cyclopyrophosphate is a regulator of salicylic acid and jasmonic acid crosstalk', *Journal of Experimental Botany*, 67(5), pp. 1557–1566. doi: 10.1093/jxb/erv550.
- Lepistö, A. and Rintamäki, E. (2012) 'Coordination of plastid and light signaling pathways upon development of arabidopsis leaves under various photoperiods', *Molecular Plant*, 5(4), pp. 799–816. doi: 10.1093/mp/ssr106.
- Li, L., Ljung, K., Breton, G., Li, L., Ljung, K., Breton, G., Schmitz, R. J., Pruneda-Paz, J., Cowing-Zitron, C., Cole, B. J., Ivans, L. J., Pedmale, U. V., Jung, H.-S., Ecker, J. R., Kay, S. A. and Chory, J. (2012) 'Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture', *Genes & Development*, 26, pp. 785–790. doi: 10.1101/gad.187849.112.
- Lin, X.-L., Niu, D., Hu, Z.-L., Kim, D. H., Jin, Y. H., Cai, B., Liu, P., Miura, K., Yun, D.-J., Kim, W.-Y., Lin, R. and Jin, J. B. (2016) 'An Arabidopsis SUMO E3 Ligase, SIZ1, Negatively Regulates Photomorphogenesis by Promoting COP1 Activity', *PLOS Genetics*, 12(4), p. e1006016. doi: 10.1371/journal.pgen.1006016.

- Lorrain, S., Allen, T., Duek, P. D., Whitelam, G. C. and Fankhauser, C. (2008) 'Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors', *Plant Journal*, 53(2), pp. 312–323. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03341.x.
- Mandel, M. a, Feldmann, K. a, Herrera-Estrella, L., Rocha-Sosa, M. and León, P. (1996) 'CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution.', *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 9(5), pp. 649–58.
- Martín, G., Leivar, P., Ludevid, D., Tepperman, J. M., Quail, P. H. and Monte, E. (2016) 'Phytochrome and retrograde signalling pathways converge to antagonistically regulate a light-induced transcriptional network', *Nature communications*, 7(May), p. 11431. doi: 10.1038/ncomms11431.
- Martínez-García, J. F., Gallemí, M., Molina-Contreras, M. J., Llorente, B., Bevilacqua, M. R. R. and Quail, P. H. (2014) 'The shade avoidance syndrome in Arabidopsis: The antagonistic role of phytochrome A and B differentiates vegetation proximity and canopy shade', *PLoS ONE*, 9(10). doi: 10.1371/journal.pone.0109275.
- Martínez-García, J. F., Galstyan, A., Salla-Martret, M., Cifuentes-Esquivel, N., Gallemí, M. and Bou-Torrent, J. (2010) 'Regulatory Components of Shade Avoidance Syndrome', *Advances in Botanical Research*, 53(November 2015), pp. 65–116. doi: 10.1016/S0065-2296(10)53003-9.
- Matsushita, T., Mochizuki, N. and Nagatani, A. (2003) 'Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus', *Nature*, 424(6948), pp. 571–4. doi: 10.1038/nature01837.
- McCormac, A. C. and Terry, M. J. (2004) 'The nuclear genes Lhcb and HEMA1 are differentially sensitive to plastid signals and suggest distinct roles for the GUN1 and GUN5 plastid-signalling pathways during de-etiolation', *Plant Journal*, 40(5), pp. 672–685. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02243.x.
- McQuinn, R. P., Giovannoni, J. J. and Pogson, B. J. (2015) 'More than meets the eye: From carotenoid biosynthesis, to new insights into apocarotenoid signaling', *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, 27, pp. 172–179. doi: 10.1016/j.pbi.2015.06.020.
- Medzihradsky, M., Bindics, J., Ádám, É., Viczián, A., Klement, É., Lorrain, S., Gyula, P., Mérai, Z., Fankhauser, C., Medzihradsky, K. F., Kunkel, T., Schäfer, E. and Nagy, F. (2013) 'Phosphorylation of phytochrome B inhibits light-induced signaling via accelerated dark reversion in Arabidopsis', *The Plant cell*, 25(2), pp. 535–44. doi: 10.1105/tpc.112.106898.
- Meier, S., Tzfadia, O., Vallabhaneni, R., Gehring, C. and Wurtzel, E. T. (2011) 'A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in Arabidopsis thaliana', *BMC systems biology*, 5(1), p. 77. doi: 10.1186/1752-0509-5-77.
- Mitula, F., Tajdel, M., Ciesla, A., Kasprówicz-Maluski, A., Kulik, A., Babula-Skowronska, D., Michalak, M., Dobrowolska, G., Sadowski, J. and Ludwików, A. (2015) 'Arabidopsis ABA-

- Activated Kinase MAPKKK18 is Regulated by Protein Phosphatase 2C ABI1 and the Ubiquitin-Proteasome Pathway', *Plant and Cell Physiology*, 56(12), pp. 2351–2367. doi: 10.1093/pcp/pcv146.
- Mochizuki, N., Brusslan, J. a, Larkin, R., Nagatani, a and Chory, J. (2001) 'Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), pp. 2053–2058. doi: 10.1073/pnas.98.4.2053.
- Mochizuki, N., Tanaka, R., Tanaka, A., Masuda, T. and Nagatani, A. (2008) 'The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in Arabidopsis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(39), pp. 15184–15189. doi: 10.1073/pnas.0803245105.
- Monte, E., Ecker, J. R., Zhang, Y., Li, X., Young, J., Austin-phillips, S. and Quail, P. H. (2003) 'Isolation and Characterization of phyC Mutant in Arabidopsis Reveals Complex Crosstalk between Phytochrome Signaling Pathways', *The Plant Cell*, 15(September), pp. 1962–1980. doi: 10.1105/tpc.012971.
- Moran, N. A. and Jarvik, T. (2010) 'Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids', *Science (New York, N.Y.)*, 328(5978), pp. 624–627. doi: 10.1126/science.1187113.
- Müller, P., Li, X. P. and Niyogi, K. K. (2001) 'Non-photochemical quenching. A response to excess light energy', *Plant physiology*, 125(4), pp. 1558–1566. doi: 10.1104/pp.125.4.1558.
- Mullineaux, P. M., Karpinski, S. and Baker, N. R. (2006) 'Spatial Dependence for Hydrogen Peroxide-Directed Signaling in Light-Stressed Plants 1', *Plant physiology*, 141(June), pp. 346–350. doi: 10.1104/pp.106.078162.
- Muramoto, T., Kohchi, T., Yokota, a, Hwang, I. and Goodman, H. M. (1999) 'The Arabidopsis photomorphogenic mutant hy1 is deficient in phytochrome chromophore biosynthesis as a result of a mutation in a plastid heme oxygenase.', *The Plant cell*, 11(3), pp. 335–348. doi: 10.1105/tpc.11.3.335.
- Nakagawa, T., Suzuki, T., Murata, S., Nakamura, S., Hino, T., Maeo, K., Tabata, R., Kawai, T., Tanaka, K., Niwa, Y., Watanabe, Y., Nakamura, K., Kimura, T. and Ishiguro, S. (2007) 'Improved Gateway Binary Vectors: High-Performance Vectors for Creation of Fusion Constructs in Transgenic Analysis of Plants', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(8), pp. 2095–2100. doi: 10.1271/bbb.70216.
- Nito, K., Wong, C. C. L., Yates, J. R. and Chory, J. (2013) 'Tyrosine Phosphorylation Regulates the Activity of Phytochrome Photoreceptors', *Cell Reports*, 3(6), pp. 1970–1979. doi: 10.1016/j.celrep.2013.05.006.
- Niyogi, K. (1999) 'Photoprotection Revisited: Genetic and Molecular Approaches', *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 50, pp. 333–359. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.333.

- Van Norman, J. M., Zhang, J., Cazzonelli, C. I., Pogson, B. J., Harrison, P. J., Bugg, T. D. H., Chan, K. X., Thompson, A. J. and Benfey, P. N. (2014) 'Periodic root branching in *Arabidopsis* requires synthesis of an uncharacterized carotenoid derivative', *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(13), pp. E1300-9. doi: 10.1073/pnas.1403016111.
- Nott, A., Jung, H.-S., Koussevitzky, S. and Chory, J. (2006) 'Plastid-to-nucleus retrograde signaling', *Annual review of plant biology*, 57, pp. 739–759. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105310.
- Nozue, K., Tat, A. V., Kumar Devisetty, U., Robinson, M., Mumbach, M. R., Ichihashi, Y., Lekkala, S. and Maloof, J. N. (2015) 'Shade Avoidance Components and Pathways in Adult Plants Revealed by Phenotypic Profiling', *PLoS Genetics*, 11(4), pp. 1–26. doi: 10.1371/journal.pgen.1004953.
- Oh, S. and Montgomery, B. L. (2013) 'Phytochrome-induced SIG2 expression contributes to photoregulation of phytochrome signalling and photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*', *Journal of Experimental Botany*, 64(18), pp. 5457–5472. doi: 10.1093/jxb/ert308.
- Osterlund, M. T., Hardtke, C. S., Wei, N. and Deng, X. W. (2000) 'Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*', *Nature*, 405(6785), pp. 462–466. doi: 10.1038/35013076.
- Oyama, T., Shimura, Y. and Okada, K. (1997) 'The *Arabidopsis* HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl', *Genes & Development*, pp. 2983–2995. doi: 10.1101/gad.11.22.2983.
- Pacín, M., Legris, M. and Casal, J. J. (2013) 'COP1 re-accumulates in the nucleus under shade', *Plant Journal*, 75(4), pp. 631–641. doi: 10.1111/tpj.12226.
- Park, H., Kreunen, S. S., Cuttriss, A. J., DellaPenna, D. and Pogson, B. J. (2002) 'Identification of the Carotenoid Isomerase Provides Insight into Carotenoid Biosynthesis, Prolamellar Body Formation, and Photomorphogenesis', *The Plant cell*, 14(February), pp. 321–332. doi: 10.1105/tpc.010302.
- Pérez-Gil, J. (2013) 'Biosíntesi d'isoprenoides en bacteris i plantes. Aproximacions biotecnològiques', Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, España.
- Petrillo, E., Godoy Herz, M. A., Fuchs, A., Reifer, D., Fuller, J., Yanovsky, M. J., Simpson, C., Brown, J. W. S., Barta, A., Kalyna, M., Kornblihtt, A. R., Herz, M. A. G., Fuchs, A., Reifer, D., Fuller, J., Yanovsky, M. J., Simpson, C., Brown, J. W. S., Barta, A., Kalyna, M. and Kornblihtt, A. R. (2014) 'A Chloroplast Retrograde Signal Regulates Nuclear Alternative Splicing', *Science*, 344(6182), pp. 427–30. doi: 10.1126/science.1250322.
- Pfaffl, M. W. (2001) 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR', *Nucleic acids research*, 29(9), p. e45.
- Pfannschmidt, T. and Liere, K. (2005) 'Redox regulation and modification of proteins controlling chloroplast gene expression', *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(5–6), pp. 607–618. doi: 10.1089/ars.2005.7.607.

- Phillips, M. A., León, P., Boronat, A. and Rodríguez-Concepción, M. (2008) 'The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources', *Trends in Plant Science*, 13(12), pp. 619–623. doi: 10.1016/j.tplants.2008.09.003.
- Pogson, B. J., Woo, N. S., Förster, B. and Small, I. D. (2008) 'Plastid signalling to the nucleus and beyond', *Trends in Plant Science*, pp. 602–609. doi: 10.1016/j.tplants.2008.08.008.
- Pogson, B., McDonald, K. A., Truong, M., Britton, G. and DellaPenna, D. (1996) 'Arabidopsis carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants.', *Plant Cell*, 8(9), pp. 1627–1639. doi: 10.1105/tpc.8.9.1627.
- Pokhilko, A., Bou-Torrent, J., Pulido, P., Rodríguez-Concepción, M. and Ebenhöf, O. (2015) 'Mathematical modelling of the diurnal regulation of the MEP pathway in Arabidopsis', *New Phytologist*, 206(3), pp. 1075–1085. doi: 10.1111/nph.13258.
- Pulido, P., Perello, C. and Rodriguez-Concepcion, M. (2012) 'New insights into plant Isoprenoid metabolism', *Molecular Plant*, 5(5), pp. 964–967. doi: 10.1093/mp/sss088.
- Quail, P. H. (1994) 'Phytochrome genes and their expression', in Kendrick, R. E. and Kronenberg, G. H. M. (eds) *Photomorphogenesis in Plants*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 71–104. doi: 10.1007/978-94-011-1884-2_5.
- Ramel, F., Birtic, S., Ginies, C., Soubigou-Taconnat, L., Triantaphylides, C. and Havaux, M. (2012) 'Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(14), pp. 5535–5540. doi: 10.1073/pnas.1115982109.
- Rapp, J. C. and Mullet, J. E. (1991) 'Chloroplast transcription is required to express the nuclear genes *rbcS* and *cab*. Plastid DNA copy number is regulated independently', *Plant Molecular Biology*, 17(4), pp. 813–823. doi: 10.1007/BF00037063.
- Reddy, S. K., Holalu, S. V., Casal, J. J. and Finlayson, S. A. (2013) 'Abscisic acid regulates axillary bud outgrowth responses to the ratio of red to far-red light', *Plant physiology*, 163(2), pp. 1047–58. doi: 10.1104/pp.113.221895.
- Rodríguez-Concepción, M. (2006) 'Early steps in isoprenoid biosynthesis: Multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells', *Phytochemistry Reviews*, 5(1), pp. 1–15. doi: 10.1007/s11101-005-3130-4.
- Rodríguez-Concepción, M. and Boronat, A. (2002) 'Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics', *Plant physiology*, 130(3), pp. 1079–1089. doi: 10.1104/pp.007138.
- Rodríguez-Concepción, M., Forés, O., Martínez-García, J. F., González, V., Phillips, M. A., Ferrer, A. and Boronat, A. (2004) 'Distinct Light-Mediated Pathways Regulate the Biosynthesis and Exchange of Isoprenoid Precursors during Arabidopsis Seedling Development', *The Plant Cell*, 16(January), pp. 144–156. doi: 10.1105/tpc.016204.

- Rodríguez-Villalón, A., Gas, E. and Rodríguez-Concepción, M. (2009a) 'Colors in the dark', 4(10), pp. 965–967. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03966.x.arotenoids.
- Rodríguez-Villalón, A., Gas, E. and Rodríguez-Concepción, M. (2009b) 'Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown *Arabidopsis* seedlings', *Plant Journal*, 60(3), pp. 424–435. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03966.x.
- Roig-Villanova, I., Bou-Torrent, J., Galstyan, A., Carretero-Paulet, L., Portolés, S., Rodríguez-Concepción, M. and Martínez-García, J. F. (2007) 'Interaction of shade avoidance and auxin responses: a role for two novel atypical bHLH proteins', *The EMBO journal*, 26(22), pp. 4756–4767. doi: 10.1038/sj.emboj.7601890.
- Roig-Villanova, I., Bou, J., Sorin, C., Devlin, P. F. and Martínez-García, J. F. (2006) 'Identification of primary target genes of phytochrome signaling. Early transcriptional control during shade avoidance responses in *Arabidopsis*', *Plant physiology*, 141(1), pp. 85–96. doi: 10.1104/pp.105.076331.
- Roig-Villanova, I. and Martínez-García, J. F. (2016) 'Plant Responses to Vegetation Proximity: A Whole Life Avoiding Shade', *Front. Plant Sci.*, 7(February), pp. 1–10. doi: 10.3389/fpls.2016.00236.
- Rolauffs, S., Fackendahl, P., Sahm, J., Fiene, G. and Hoecker, U. (2012) 'Arabidopsis COP1 and SPA genes are essential for plant elongation but not for acceleration of flowering time in response to a low red light to far-red light ratio.', *Plant physiology*, 160(4), pp. 2015–27. doi: 10.1104/pp.112.207233.
- Rossel, J. B., Wilson, P. B., Hussain, D., Woo, N. S., Gordon, M. J., Mewett, O. P., Howell, K. a, Whelan, J., Kazan, K. and Pogson, B. J. (2007) 'Systemic and intracellular responses to photooxidative stress in *Arabidopsis*.', *The Plant cell*, 19(December), pp. 4091–4110. doi: 10.1105/tpc.106.045898.
- Ruckle, M. E., Burgoon, L. D., Lawrence, L. a., Sinkler, C. a. and Larkin, R. M. (2012) 'Plastids Are Major Regulators of Light Signaling in *Arabidopsis*', *Plant Physiology*, 159(1), pp. 366–390. doi: 10.1104/pp.112.193599.
- Ruckle, M. E., DeMarco, S. M. and Larkin, R. M. (2007) 'Plastid signals remodel light signaling networks and are essential for efficient chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*.', *The Plant cell*, 19(12), pp. 3944–3960. doi: 10.1105/tpc.107.054312.
- Ruckle, M. E. and Larkin, R. M. (2009) 'Plastid signals that affect photomorphogenesis in', *New Phytologist*, pp. 367–379. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02729.x.
- Ruiz-Sola, M. Á., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., Rodríguez-Concepción, M. and Rodríguez-Villalón, A. (2014) 'A root specific induction of carotenoid biosynthesis contributes to ABA production upon salt stress in *arabidopsis*', *PLoS ONE*, 9(3). doi: 10.1371/journal.pone.0090765.

- Ruiz-Sola, M. Á. and Rodríguez-Concepción, M. (2012) 'Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway', *Arabidopsis Book*, 10, p. e0158. doi: 10.1199/tab.0158.
- Sánchez, J. P., Duque, P. and Chua, N. H. (2004) 'ABA activates ADPR cyclase and cADPR induces a subset of ABA-responsive genes in Arabidopsis', *Plant Journal*, 38(3), pp. 381–395. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02055.x.
- Sanger, F. and Coulson, A. R. (1975) 'A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.', *Journal of molecular biology*, 94(3), pp. 441–8.
- Sawa, S., Ohgishi, M., Goda, H., Higuchi, K., Shimada, Y., Yoshida, S. and Koshiba, T. (2002) 'The HAT2 gene, a member of the HD-Zip gene family, isolated as an auxin inducible gene by DNA microarray screening, affects auxin response in Arabidopsis', *Plant Journal*, 32(6), pp. 1011–1022. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01488.x.
- Schlicke, H., Hartwig, A. S., Firtzlaff, V., Richter, A. S., Glässer, C., Maier, K., Finkemeier, I. and Grimm, B. (2014) 'Induced deactivation of genes encoding chlorophyll biosynthesis enzymes disentangles tetrapyrrole-mediated retrograde signaling', *Molecular Plant*, 7(7), pp. 1211–1227. doi: 10.1093/mp/ssu034.
- Schwartz, S. H., Léon-kloosterziel, K. M., Koornneef, M. and Zeevaart, J. a D. (1991) 'Biochemical Characterization', 911837(1 997), pp. 161–166.
- Sellaro, R., Crepy, M., Trupkin, S. A., Karayekov, E., Buchovsky, A. S., Rossi, C. and Casal, J. J. (2010) 'Cryptochrome as a sensor of the blue/green ratio of natural radiation in Arabidopsis.', *Plant physiology*, 154(1), pp. 401–9. doi: 10.1104/pp.110.160820.
- Sellaro, R., Hoecker, U., Yanovsky, M., Chory, J. and Casal, J. J. (2009) 'Synergism of Red and Blue Light in the Control of Arabidopsis Gene Expression and Development', *Current Biology*. Elsevier Ltd, 19(14), pp. 1216–1220. doi: 10.1016/j.cub.2009.05.062.
- Sellaro, R., Pacín, M. and Casal, J. J. (2012) 'Diurnal dependence of growth responses to shade in Arabidopsis: Role of hormone, clock, and light signaling', *Molecular Plant*, 5(3), pp. 619–628. doi: 10.1093/mp/ssr122.
- Sellaro, R., Yanovsky, M. J. and Casal, J. J. (2011) 'Repression of shade-avoidance reactions by sunfleck induction of HY5 expression in Arabidopsis', *Plant Journal*, 68(5), pp. 919–928. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04745.x.
- Sentandreu, M., Martin, G., Gonzalez-Schain, N., Leivar, P., Soy, J., Tepperman, J. M., Quail, P. H. and Monte, E. (2011) 'Functional Profiling Identifies Genes Involved in Organ-Specific Branches of the PIF3 Regulatory Network in Arabidopsis', *The Plant Cell*, 23(11), pp. 3974–3991. doi: 10.1105/tpc.111.088161.
- Seo, M. and Koshiba, T. (2002) 'Complex regulation of ABA biosynthesis in plants', *Trends in Plant Science*, 7(1), pp. 41–48. doi: 10.1016/S1360-1385(01)02187-2.
- Sessa, G., Carabelli, M., Sassi, M., Ciolfi, A., Possenti, M., Mitterpergher, F., Becker, J., Morelli, G. and Ruberti, I. (2005) 'A dynamic balance between gene activation and repression

- regulates the shade avoidance response in *Arabidopsis*', *Genes & ...*, 19(23), pp. 2811–2815. doi: 10.1101/gad.364005.GENES.
- Shen, Y.-Y., Wang, X.-F., Wu, F.-Q., Du, S.-Y., Cao, Z., Shang, Y., Wang, X.-L., Peng, C.-C., Yu, X.-C., Zhu, S.-Y., Fan, R.-C., Xu, Y.-H. and Zhang, D.-P. (2006) 'The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor', *Nature*, 443(7113), pp. 823–826. doi: 10.1038/nature05176.
- Shi, H., Zhong, S., Mo, X., Liu, N., Nezames, C. D. and Deng, X. W. (2013) 'HFR1 sequesters PIF1 to govern the transcriptional network underlying light-initiated seed germination in *Arabidopsis*.', *The Plant cell*, 25(10), pp. 3770–84. doi: 10.1105/tpc.113.117424.
- Shin, J., Park, E. and Choi, G. (2007) 'PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in *Arabidopsis*', *Plant Journal*, 49(6), pp. 981–994. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.03021.x.
- Shumbe, L., Bott, R. and Havaux, M. (2014) 'Dihydroactinidiolide, a high light-induced ??-carotene derivative that can regulate gene expression and photoacclimation in *Arabidopsis*', *Molecular Plant*, 7(7), pp. 1248–1251. doi: 10.1093/mp/ssu028.
- Sibout, R., Sukumar, P., Hettiarachchi, C., Holm, M., Muday, G. K. and Hardtke, C. S. (2006) 'Opposite root growth phenotypes of *hy5* versus *hy5 hyh* mutants correlate with increased constitutive auxin signaling', *PLoS Genetics*, 2(11), pp. 1898–1911. doi: 10.1371/journal.pgen.0020202.
- Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Singh, V. P. and Prasad, S. M. (2015) 'Retrograde signaling between plastid and nucleus: A review', *Journal of Plant Physiology*. Elsevier GmbH, 181, pp. 55–66. doi: 10.1016/j.jplph.2015.04.001.
- Smith, H. (2000) 'Phytochromes and light signal perception by plants--an emerging synthesis.', *Nature*, 407, pp. 585–591. doi: 10.1038/35036500.
- Sokolova, V., Bindics, J., Kircher, S., Adam, E., Schafer, E., Nagy, F. and Viczian, a. (2012) 'Missense Mutation in the Amino Terminus of Phytochrome A Disrupts the Nuclear Import of the Photoreceptor', *Plant Physiology*, 158(1), pp. 107–118. doi: 10.1104/pp.111.186288.
- Song, Y. H., Yoo, C. M., Hong, A. P., Kim, S. H., Jeong, H. J., Shin, S. Y., Kim, H. J., Yun, D.-J., Lim, C. O., Bahk, J. D., Lee, S. Y., Nagao, R. T., Key, J. L. and Hong, J. C. (2008) 'DNA-binding study identifies C-box and hybrid C/G-box or C/A-box motifs as high-affinity binding sites for STF1 and LONG HYPOCOTYL5 proteins.', *Plant physiology*, 146(4), pp. 1862–1877. doi: 10.1104/pp.107.113217.
- Strand, A., Asami, T., Alonso, J., Ecker, J. R. and Chory, J. (2003) 'Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX', *Nature*, 5(October 2002), pp. 79–83. doi: 10.1038/nature01250.1.
- Su, Y. and Lagarias, J. C. (2007) 'Light-independent phytochrome signaling mediated by dominant GAF domain tyrosine mutants of *Arabidopsis* phytochromes in transgenic plants.', *The Plant cell*, 19(7), pp. 2124–2139. doi: 10.1105/tpc.107.051516.

- Sun, J., Qi, L., Li, Y., Chu, J. and Li, C. (2012) 'Pif4-mediated activation of yucca8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating arabidopsis hypocotyl growth', *PLoS Genetics*, 8(3). doi: 10.1371/journal.pgen.1002594.
- Sun, X., Feng, P., Xu, X., Guo, H., Ma, J., Chi, W., Lin, R., Lu, C. and Zhang, L. (2011) 'A chloroplast envelope-bound PHD transcription factor mediates chloroplast signals to the nucleus', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 2, p. 477. doi: 10.1038/ncomms1486.
- Susek, R. E., Ausubel, F. M. and Chory, J. (1993) 'Signal transduction mutants of Arabidopsis uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development', *Cell*, 74(5), pp. 787–799. doi: 10.1016/0092-8674(93)90459-4.
- Tadini, L., Pesaresi, P., Kleine, T., Rossi, F., Guljamow, A., Sommer, F., Mühlhaus, T., Schroda, M., Masiero, S., Pribil, M., Rothbart, M., Hedtke, B., Grimm, B. and Leister, D. (2016) 'GUN1 Controls Accumulation of the Plastid Ribosomal Protein S1 at the Protein Level and Interacts with Proteins Involved in Plastid Protein Homeostasis.', *Plant physiology*, 170(3), pp. 1817–30. doi: 10.1104/pp.15.02033.
- Tameshige, T., Fujita, H., Watanabe, K., Toyokura, K., Kondo, M., Tatematsu, K., Matsumoto, N., Tsugeki, R., Kawaguchi, M., Nishimura, M. and Okada, K. (2013) 'Pattern Dynamics in Adaxial-Abaxial Specific Gene Expression Are Modulated by a Plastid Retrograde Signal during Arabidopsis thaliana Leaf Development', *PLoS Genetics*, 9(7). doi: 10.1371/journal.pgen.1003655.
- Tao, Y., Ferrer, J. L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J. A., Li, L., Moreno, J. E., Bowman, M. E., Ivans, L. J., Cheng, Y., Lim, J., Zhao, Y., Ballaré, C. L., Sandberg, G., Noel, J. P. and Chory, J. (2008) 'Rapid Synthesis of Auxin via a New Tryptophan-Dependent Pathway Is Required for Shade Avoidance in Plants', *Cell*, 133(1), pp. 164–176. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.049.
- Terry, M. J. and Smith, A. G. (2013) 'A model for tetrapyrrole synthesis as the primary mechanism for plastid-to-nucleus signaling during chloroplast biogenesis.', *Frontiers in plant science*, 4(February), p. 14. doi: 10.3389/fpls.2013.00014.
- Tian, L., Musetti, V., Kim, J., Magallanes-Lundback, M. and DellaPenna, D. (2004) 'The Arabidopsis LUT1 locus encodes a member of the cytochrome p450 family that is required for carotenoid epsilon-ring hydroxylation activity.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, pp. 402–407. doi: 10.1073/pnas.2237237100.
- Tikkanen, M., Gollan, P. J., Suorsa, M., Kangasjärvi, S. and Aro, E.-M. (2012) 'STN7 Operates in Retrograde Signaling through Controlling Redox Balance in the Electron Transfer Chain.', *Frontiers in plant science*, 3(December), p. 277. doi: 10.3389/fpls.2012.00277.
- Timmis, J. N., Ayliffe, M. A., Huang, C. Y. and Martin, W. (2004) 'Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes', 5(February). doi: 10.1038/nrg1271.

- Toledo-Ortiz, G., Huq, E. and Rodríguez-Concepción, M. (2010) 'Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(25), pp. 11626–11631. doi: 10.1073/pnas.0914428107.
- Toledo-Ortiz, G., Johansson, H., Lee, K. P., Bou-Torrent, J., Stewart, K., Steel, G., Rodríguez-Concepción, M. and Halliday, K. J. (2014) 'The HY5-PIF Regulatory Module Coordinates Light and Temperature Control of Photosynthetic Gene Transcription', *PLoS Genetics*, 10(6). doi: 10.1371/journal.pgen.1004416.
- Tsuzuki, T., Takahashi, K., Inoue, S. ichiro, Okigaki, Y., Tomiyama, M., Hossain, M. A., Shimazaki, K. ichiro, Murata, Y. and Kinoshita, T. (2011) 'Mg-chelatase H subunit affects ABA signaling in stomatal guard cells, but is not an ABA receptor in *Arabidopsis thaliana*', *Journal of Plant Research*, 124(4), pp. 527–538. doi: 10.1007/s10265-011-0426-x.
- Vinti, G., Hills, A., Campbell, S., Bowyer, J. R., Mochizuki, N., Chory, J. and López-Juez, E. (2000) 'Interactions between *hy1* and *gun* mutants of *Arabidopsis*, and their implications for plastid/nuclear signalling', *Plant Journal*, 24(6), pp. 883–894. doi: 10.1046/j.1365-313X.2000.00936.x.
- Voesenek, L. A. C. J. and Sasidharan, R. (2013) 'Ethylene - and oxygen signalling - drive plant survival during flooding', *Plant Biology*, 15(3), pp. 426–435. doi: 10.1111/plb.12014.
- Voigt, C., Oster, U., Börnke, F., Jahns, P., Dietz, K. J., Leister, D. and Kleine, T. (2010) 'In-depth analysis of the distinctive effects of norflurazon implies that tetrapyrrole biosynthesis, organellar gene expression and ABA cooperate in the GUN-type of plastid signalling', *Physiologia Plantarum*, 138(4), pp. 503–519. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01343.x.
- Von Litig, J., Welsch, R., Bonk, M., Giuliano, G., Batschauer, A. and Kleining, H. (1997) 'Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings', *Plant Journal*, 12(3), 625-634.
- Wang, H. (2001) 'Direct Interaction of *Arabidopsis* Cryptochromes with COP1 in Light Control Development', *Science*, 294(5540), pp. 154–158. doi: 10.1126/science.1063630.
- Wang, H., Zhu, Y., Fujioka, S., Asami, T., Li, J. and Li, J. (2009) 'Regulation of *Arabidopsis* brassinosteroid signaling by atypical basic helix-loop-helix proteins.', *The Plant cell*, 21(12), pp. 3781–3791. doi: 10.1105/tpc.109.072504.
- Waters, M. T., Wang, P., Korkaric, M., Capper, R. G., Saunders, N. J. and Langdale, J. a (2009) 'GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic apparatus in *Arabidopsis*.', *The Plant cell*, 21(4), pp. 1109–1128. doi: 10.1105/tpc.108.065250.
- Woitsch, S. and Ro, S. (2003) 'Expression of Xanthophyll Biosynthetic Genes during Light-Dependent Chloroplast Differentiation 1', 132, pp. 1508–1517. doi: 10.1104/pp.102.019364.).

- Woodson, J. D. and Chory, J. (2008) 'Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes', *Nature reviews. Genetics*, 9(5), pp. 383–395. doi: 10.1038/nrg2348.
- Woodson, J. D., Perez-Ruiz, J. M. and Chory, J. (2011) 'Heme synthesis by plastid ferrochelatase i regulates nuclear gene expression in plants', *Current Biology*, 21(10), pp. 897–903. doi: 10.1016/j.cub.2011.04.004.
- Woodson, J. D., Perez-Ruiz, J. M., Schmitz, R. J., Ecker, J. R. and Chory, J. (2013) 'Sigma factor-mediated plastid retrograde signals control nuclear gene expression', *Plant Journal*, 73(1), pp. 1–13. doi: 10.1111/tpj.12011.
- Wright, L. P., Rohwer, J. M., Ghirardo, A., Hammerbacher, A., Ortiz-Alcaide, M., Raguschke, B., Schnitzler, J.-P., Gershenzon, J. and Phillips, M. a (2014) 'Deoxyxylulose 5-Phosphate Synthase Controls Flux through the Methylerythritol 4-Phosphate Pathway in Arabidopsis', *Plant physiology*, 165(4), pp. 1488–1504. doi: 10.1104/pp.114.245191.
- Xiao, Y., Savchenko, T., Baidoo, E. E. K., Chehab, W. E., Hayden, D. M., Tolstikov, V., Corwin, J. a., Kliebenstein, D. J., Keasling, J. D. and Dehesh, K. (2012) 'Retrograde signaling by the plastidial metabolite MEcPP regulates expression of nuclear stress-response genes', *Cell*. Elsevier Inc., 149(7), pp. 1525–1535. doi: 10.1016/j.cell.2012.04.038.
- Xu, X., Chi, W., Sun, X., Feng, P., Guo, H., Li, J., Lin, R., Lu, C., Wang, H., Leister, D. and Zhang, L. (2016) 'Convergence of light and chloroplast signals for de-etiolation through ABI4–HY5 and COP1', *Nature Plants*. Nature Publishing Group, 2(May), p. 16066. doi: 10.1038/nplants.2016.66.
- Yamaguchi, R., Nakamura, M., Mochizuki, N., Kay, S. A. and Nagatani, A. (1999) 'Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic Arabidopsis', *Journal of Cell Biology*, 145(3), pp. 437–445. doi: 10.1083/jcb.145.3.437.
- Yanowsky, M. J., Casal, J. J. and Whitelam, G. C. (1995) 'Phytochrome A, phytochrome B and HY4 are involved in hypocotyl growth responses to natural radiation in Arabidopsis: weak de-etiolation of the phyA mutant under dense canopies', *Plant, Cell & Environment*, 18(7), pp. 788–794. doi: 10.1111/j.1365-3040.1995.tb00582.x.
- Yuan, H., Zhang, J., Nageswaran, D. and Li, L. (2015) 'Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops', *Horticulture Research*, 2(July), p. 15036. doi: 10.1038/hortres.2015.36.
- Zalejski, C., Paradis, S., Maldiney, R., Habricot, Y., Miginiac, E., Rona, J.-P. and Jeannette, E. (2006) 'Induction of abscisic acid-regulated gene expression by diacylglycerol pyrophosphate involves Ca²⁺ and anion currents in Arabidopsis suspension cells', *Plant physiology*, 141(4), pp. 1555–1562. doi: 10.1104/pp.106.080218.
- Zhang, J., Stankey, R. J. and Vierstra, R. D. (2013a) 'Structure-guided engineering of plant phytochrome B with altered photochemistry and light signaling', *Plant physiology*, 161(3), pp. 1445–57. doi: 10.1104/pp.112.208892.

- Zhang, L.-Y., Bai, M.-Y., Wu, J., Zhu, J.-Y., Wang, H., Zhang, Z., Wang, W., Sun, Y., Zhao, J., Sun, X., Yang, H., Xu, Y., Kim, S.-H., Fujioka, S., Lin, W.-H., Chong, K., Lu, T. and Wang, Z.-Y. (2009) 'Antagonistic HLH/bHLH transcription factors mediate brassinosteroid regulation of cell elongation and plant development in rice and Arabidopsis', *The Plant cell*, 21(12), pp. 3767–3780. doi: 10.1105/tpc.109.070441.
- Zhang, Y., Mayba, O., Pfeiffer, A., Shi, H., Tepperman, J. M., Speed, T. P. and Quail, P. H. (2013b) 'A Quartet of PIF bHLH Factors Provides a Transcriptionally Centered Signaling Hub That Regulates Seedling Morphogenesis through Differential Expression-Patterning of Shared Target Genes in Arabidopsis', *PLoS Genetics*, 9(1), pp. 11–13. doi: 10.1371/journal.pgen.1003244.
- Zhang, Z. W., Yuan, S., Feng, H., Xu, F., Cheng, J., Shang, J., Zhang, D. W. and Lin, H. H. (2011) 'Transient accumulation of Mg-protoporphyrin IX regulates expression of PhANGs - New evidence for the signaling role of tetrapyrroles in mature Arabidopsis plants', *Journal of Plant Physiology*. Elsevier GmbH., 168(7), pp. 714–721. doi: 10.1016/j.jplph.2010.10.016.
- Zhao, W., Lv, P. and Gu, H. (2013) 'Studies on carotenoids in watermelon flesh', *Agricultural Sciences*, 4(7), pp. 13–20. doi: 10.4236/as.2013.47A003.
- Zhong, S., Shi, H., Xue, C., Wei, N., Guo, H. and Deng, X. W. (2014) 'Ethylene-orchestrated circuitry coordinates a seedling's response to soil cover and etiolated growth', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(11), pp. 1–8. doi: 10.1073/pnas.1402491111.
- Zhou, P., Song, M., Yang, Q., Su, L., Hou, P., Guo, L., Zheng, X., Xi, Y., Meng, F., Xiao, Y., Yang, L. and Yang, J. (2014) 'Both PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED1 (PAR1) and PAR2 promote seedling photomorphogenesis in multiple light signaling pathways', *Plant physiology*, 164(2), pp. 841–52. doi: 10.1104/pp.113.227231.
- Zhu, L. and Huq, E. (2014) 'Suicidal Co-Degradation of the Phytochrome Interacting Factor 3 and Phytochrome B in Response to Light', *Molecular Plant*, 7(12), pp. 1709–1711. doi: 10.1093/mp/ssu108.

Publicaciones

Regulation of Carotenoid Biosynthesis by Shade Relies on Specific Subsets of Antagonistic Transcription Factors and Cofactors^{1[OPEN]}

Jordi Bou-Torrent², Gabriela Toledo-Ortiz², Miriam Ortiz-Alcaide², Nicolas Cifuentes-Esquivel³, Karen J. Halliday, Jaime F. Martinez-García*, and Manuel Rodríguez-Concepción*

Centre for Research in Agricultural Genomics, CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain (J.B.-T., G.T.-O., M.O.-A., N.C.-E., J.F.M.-G., M.R.-C.); School of Biological Sciences, Edinburgh University, Edinburgh EH9 3JF, United Kingdom (G.T.-O., K.J.H.); and Institutió Catalana de Recerca i Estudis Avançats, 08010 Barcelona, Spain (J.F.M.-G.)

ORCID IDs: 0000-0003-1516-0341 (J.F.M.-G.); 0000-0002-1280-2305 (M.R.-C.).

Carotenoids are photosynthetic pigments essential for the protection against excess light. During deetiolation, their production is regulated by a dynamic repression-activation module formed by PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 (PIF1) and LONG HYPOCOTYL5 (HY5). These transcription factors directly and oppositely control the expression of the gene encoding PHYTOENE SYNTHASE (PSY), the first and main rate-determining enzyme of the carotenoid pathway. Antagonistic modules also regulate the responses of deetiolated plants to vegetation proximity and shade (i.e. to the perception of far-red light-enriched light filtered through or reflected from neighboring plants). These responses, aimed to adapt to eventual shading from plant competitors, include a reduced accumulation of carotenoids. Here, we show that PIF1 and related photolabile PIFs (but not photostable PIF7) promote the shade-triggered decrease in carotenoid accumulation. While HY5 does not appear to be required for this process, other known PIF antagonists were found to modulate the expression of the *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) *PSY* gene and the biosynthesis of carotenoids early after exposure to shade. In particular, PHYTOCHROME-RAPIDLY REGULATED1, a transcriptional cofactor that prevents the binding of true transcription factors to their target promoters, was found to interact with PIF1 and hence directly induce *PSY* expression. By contrast, a change in the levels of the transcriptional cofactor LONG HYPOCOTYL IN FAR RED1, which also binds to PIF1 and other PIFs to regulate shade-related elongation responses, did not impact *PSY* expression or carotenoid accumulation. Our data suggest that the fine-regulation of carotenoid biosynthesis in response to shade relies on specific modules of antagonistic transcriptional factors and cofactors.

During their lifetime, plants are exposed to large variations in the quantity and quality of the incoming light that eventually determine their growth and development. Strong sunlight sometimes overwhelms the photosynthetic capacity of plants and, hence, leads to the production of highly reactive oxygen species that can potentially damage photosynthetic and cell structures. To cope with this danger, plant chloroplasts accumulate carotenoids, photoprotective compounds that channel energy away from chlorophylls and protect against reactive oxygen species and free radicals (Niyogi, 1999; Domonkos et al., 2013). On the other hand, photosynthesis and growth can be heavily compromised by the shading of nearby plants that compete for light. Phytochromes, a family of plant photoreceptors, are able to perceive changes in light quality associated with crowded (i.e. high-density) plant environments and to rapidly transduce them into changes in gene expression aimed to anticipate and avoid shading by overgrowing neighboring plants (i.e. promoting elongation growth), readjusting photosynthetic metabolism (i.e. decreasing the production of chlorophylls and carotenoids), or launching reproductive development (Franklin, 2008; Martínez-García et al., 2010; Casal, 2013; Gommers et al., 2013).

Although regulating carotenoid biosynthesis and accumulation is central for plants to successfully adapt to changes in light quantity and quality, our understanding of how light cues regulate the accumulation of these essential metabolites is still limited (Ruiz-Sola and Rodríguez-Concepción, 2012). A first level of regulation of carotenoid accumulation in plants is the control of the transcription of biosynthetic genes. Recent reports have shown that the expression of the *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) gene encoding PHYTOENE SYNTHASE (PSY), the first and main rate-determining enzyme of the carotenoid pathway (Ruiz-Sola and Rodríguez-Concepción, 2012), is under the direct control of two transcription factors involved in the transduction of light signals: PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 (PIF1) and LONG HYPOCOTYL5 (HY5; Toledo-Ortiz et al., 2010, 2014). PIF1 is a basic helix-loop-helix (bHLH) protein that, like other members of the so-called PIF quartet (formed by PIF1, PIF3, PIF4, and PIF5, collectively referred to as PIFq), accumulates in the dark and is degraded in the light (Leivar et al., 2008a; Leivar and Quail, 2011). By contrast, HY5 belongs to the basic Leu zipper (bZIP) family, accumulates in the light, and is degraded in the dark (Lau and Deng, 2010). PIFq and HY5 act antagonistically for a broad set of responses (Kami et al.,

2010; Lau and Deng, 2010; Leivar and Quail, 2011; Chen et al., 2013), including the control of *PSY* expression and carotenoid biosynthesis (Toledo-Ortiz et al., 2010, 2014). PIF1 (repressor) and HY5 (activator) were demonstrated to bind to the same G-box motif in the promoter of *PSY*, forming a dynamic repression-activation transcriptional module that provides robustness in response to light but also to temperature cues (Toledo-Ortiz et al., 2014).

The combination of positive and negative regulators also appears to be instrumental in the responses of plants to shade (i.e. to light signals generated by the presence of nearby vegetation; Franklin, 2008; Martinez-Garcia et al., 2010; Casal, 2013). When sunlight is filtered through leaves or reflected from the surface of neighboring plants, the red light wavelengths of the spectrum are preferentially absorbed and the resulting light becomes enriched in far-red light. The reduction in the red light-far-red light ratio (R:FR) caused by plant proximity or canopy shade displaces the photoequilibrium toward the inactive form of phytochromes, hence inducing the so-called shade-avoidance syndrome (SAS) in shade-intolerant species like *Arabidopsis* and most crops. The four PIFq members and the photostable PIF7 protein have been demonstrated to directly contribute to the SAS (Lorrain et al., 2008; Hornitschek et al., 2012; Leivar et al., 2012; Li et al., 2012; Sellaro et al., 2012). Exposure to low R:FR promotes PIFq protein accumulation (Lorrain et al., 2008; Leivar et al., 2012) and binding of PIF7 to its target promoters (Li et al., 2012). Based on their role in promoting elongation, all PIFs are considered as positive

regulators of the SAS (Lorrain et al., 2008; Leivar et al., 2012; Li et al., 2012). A decrease in the R:FR also triggers the production of negative regulators of hypocotyl elongation, including PHYTOCHROME-RAPIDLY REGULATED1 (PAR1), its paralog PAR2, and LONG HYPOCOTYL IN FAR RED1 (HFR1). These are helix-loop-helix proteins that lack a proper DNA-binding domain and act as transcriptional cofactors (Hornitschek et al., 2009; Galstyan et al., 2011, 2012): that is, they regulate gene expression by heterodimerizing with true bHLH transcription factors. For example, both PAR1 and HFR1 interact with PIFs and prevent their binding to their target promoters (Hornitschek et al., 2009; Hao et al., 2012; Shi et al., 2013). This dynamic balance of positive (PIFs) and negative (PAR1 and HFR1) regulators of the SAS was proposed to function as a gas-and-brake mechanism that prevents an excessive elongation in response to the initial low R:FR signal (Sessa et al., 2005; Roig-Villanova et al., 2007). Although a role for HY5 in the SAS has been proposed in plants grown under prolonged low R:FR (Sellaro et al., 2011; Ciolfi et al., 2013), the relevance of the antagonistic PIFq-HY5 module in the response to plant proximity remains to be determined.

Whereas the main output response of the SAS studied to date is elongation growth in seedlings, low R:FR also triggers a reduction in the levels of photosynthetic pigments (including carotenoids) in seedlings and adult plants (Roig-Villanova et al., 2007; Patel et al., 2013). Here, we investigated to what extent PIFs and their known antagonists in the control of light responses regulate carotenoid biosynthesis, and particularly *PSY* expression, in response to plant proximity signals.

RESULTS AND DISCUSSION

PIFq Proteins Repress *PSY* Gene Expression and Eventually Carotenoid Biosynthesis under Simulated Shade

Treatment of *Arabidopsis* plants with low R:FR results in a fast increase in the level of PIFq proteins (Lorrain et al., 2008; Leivar et al., 2012) and a decreased accumulation of chlorophyll and carotenoid pigments (Roig-Villanova et al., 2007; Patel et al., 2013; Supplemental Fig. S1). To investigate whether PIFs participated in the control of carotenogenesis in response to shade, we used *Arabidopsis* wild-type (ecotype Columbia) plants, a knockout allele (*pif7-2*) impaired in PIF7 function (Leivar et al., 2008a), and a quadruple mutant line (*pifq*) defective in all four PIFq proteins (Leivar et al., 2008b). After germination and growth for 2 d under continuous white light (W), seedlings were either left under W or exposed to far-red light-supplemented white light (W+FR; a treatment referred to as simulated shade) for another 5 d. At day 7, W and W+FR samples were collected to quantify the accumulation of total carotenoids (Fig. 1). Treatment with simulated shade led to decreased carotenoid accumulation in wild-type plants but had no effect on the *pifq*

¹ This work was supported by the Spanish Dirección General de Investigación (grant nos. BIO2011–23680 [including an FPI fellowship for M.O.-A.] and BIO2011–23489), the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (JAE-DOC contract for G.T.-O.), the Gobierno de Chile (predoctoral fellowship to N.C.-E.), the Generalitat de Catalunya (grant nos. 2014SGR1434 and 2014SGR447), the Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (IBERCAROT), the U.K. Biotechnology and Biological Sciences Research Council (ROBuST, grant no. BB/F005237/1 to K.J.H.), and the European Union FP7 (TiMet, contract no. 245143) and Marie Curie (grant no. PCIG11–GA–2012–321649) programs.

² These authors contributed equally to the article.

³ Present address: Centro de Biotecnología Vegetal, Universidad Andrés Bello, 8370146 Santiago, Chile.

* Address correspondence to jaume.martinez@cragenomica.es and manuel.rodriguez@cragenomica.es.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Manuel Rodríguez-Concepción (manuel.rodriguez@cragenomica.es).

J.B.-T., G.T.-O., M.O.-A., J.F.M.-G., and M.R.-C. conceived the project and designed the experiments; J.B.-T., G.T.-O., and M.O.-A. performed most of the experiments; J.F.M.-G. and N.C.-E. carried out the analysis of the Y2H screen results; G.T.-O. and K.J.H. analyzed the ChIP assay data; J.B.-T., G.T.-O., M.O.-A., J.F.M.-G., and M.R.-C. analyzed the rest of the results; J.F.M.-G. and M.R.-C. wrote the article; J.B.-T., G.T.-O., M.O.-A., N.C.-E., J.F.M.-G., K.J.H., M.R.-C. discussed the data and revised the article.

[OPEN] Articles can be viewed without a subscription.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.15.00552

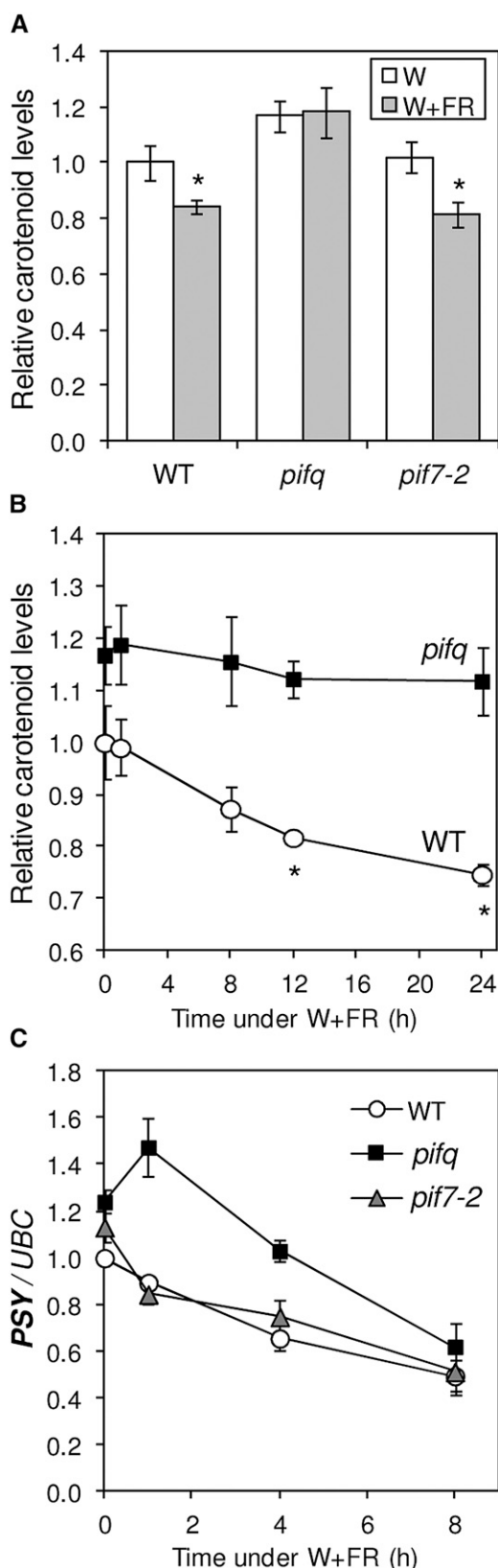


Figure 1. Carotenoid and *PSY* transcript levels in wild-type and PIF-defective plants exposed to simulated shade. A, Carotenoids quantified

mutant (Fig. 1A). By contrast, the *pif7-2* mutant showed a virtually wild-type phenotype in terms of carotenoid accumulation under both W and W+FR (Fig. 1A). The higher carotenoid content in W-grown *pifq* plants is consistent with the proposed role for PIFq proteins as repressors of carotenoid biosynthesis (Toledo-Ortiz et al., 2010), whereas the lack of response to simulated shade indicates that PIFq activity is required to repress carotenoid accumulation in response to low R:FR (W+FR). These results together suggest that PIFq proteins, but not PIF7, are negative regulators of carotenoid biosynthesis both before and after the shade signal is perceived.

Our previous work indicated that one of the mechanisms by which PIFq proteins control carotenogenesis is the direct repression of the transcriptional activity of the *PSY* gene (Toledo-Ortiz et al., 2010). To investigate the relevance of PIFq-mediated changes in *PSY* expression for the regulation of carotenoid biosynthesis in response to plant proximity light signals, the levels of both *PSY* transcripts and total carotenoids were quantified in W-grown wild-type and *pifq* seedlings at different time points after treatment with W+FR at day 7. Consistent with Figure 1A, a decline in carotenoid levels was observed in wild-type plants after exposure to simulated shade, whereas no significant ($P < 0.05$) changes occurred in the *pifq* mutant even after 24 h of W+FR illumination (Fig. 1B). *PSY* transcripts also declined in wild-type plants after transferring them to simulated shade (Fig. 1C). A virtually identical profile of *PSY* gene expression was observed in the *pif7-2* mutant (Fig. 1C). By contrast, *pifq* mutant plants showed higher levels of *PSY* transcripts under W, as anticipated (Toledo-Ortiz et al., 2010), and a reproducible increase in *PSY* expression early (1 h) after W+FR exposure. At later time points, *PSY* transcript accumulation decreased to levels similar to those of wild-type plants (Fig. 1C), an unexpected finding based on the absence of changes in the levels of carotenoids observed in *pifq* seedlings (Fig. 1B). A possible explanation is that *PSY* protein stability is increased or its degradation rate is decreased in a PIFq-defective background. Another possibility is that high PIFq activity in wild-type plants grown under low R:FR eventually results in a reduced accumulation of carotenoids in a

in wild-type (WT), *pifq*, and *pif7-2* seedlings grown for 2 d under W and then either left under W (white bars) or transferred to W+FR (gray bars) for an additional 5 d. B, Carotenoids measured in wild-type and *pifq* seedlings grown for 7 d under W and then treated with W+FR for the indicated times. C, Quantitative reverse transcription-PCR (qPCR) analysis of *PSY* transcript levels in wild-type and *pifq* seedlings grown as described in B. The *UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME* (*UBC*) gene (At5g25760) was used for normalization. Values are shown relative to those in W-grown wild-type samples and correspond to means and SD of biological triplicates ($n = 3$). The mean values for total carotenoid levels in W-grown wild-type samples were $111.03 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight (A) and $119.14 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight (B). Asterisks in A and B mark statistically significant differences ($P < 0.05$) relative to W-grown plants. In C, W+FR exposure led to statistically significant differences ($P < 0.05$) in transcript levels relative to untreated (0-h) samples for all the genes and genotypes tested.

PSY-independent manner. Consistently, PIFq proteins are known to repress the development of chloroplasts and photosynthetic structures (Leivar et al., 2008b; Leivar and Quail, 2011; Zhang et al., 2013), hence decreasing carotenoid storage capacity. We conclude that PIFq (but not PIF7) proteins repress *PSY* early after treatment with simulated shade, whereas at later stages, they repress carotenoid accumulation by mechanisms that do not necessarily rely on controlling *PSY* expression.

HY5 Is Not Required for the Shade-Triggered Down-Regulation of Carotenoid Biosynthesis

Because the combination of negative and positive regulators has been found to be instrumental in the SAS responses (Franklin, 2008; Martinez-Garcia et al., 2010; Casal, 2013), we next aimed to identify positive regulators of carotenoid biosynthesis that could counterbalance the negative role of PIFq proteins. The first selected candidate was HY5, because this transcription factor has been shown to act antagonistically with PIFq proteins in a number of physiological processes, including light-regulated elongation growth and carotenoid biosynthesis (Kami et al., 2010; Lau and Deng, 2010; Leivar and Quail, 2011; Chen et al., 2013; Toledo-Ortiz

et al., 2014). In agreement with the described role of HY5 in repressing hypocotyl elongation in the light, wild-type plants grown under W showed shorter hypocotyls than the HY5-defective *SALK_056405* line (Oh and Montgomery, 2013), here referred to as *hy5-2* (Fig. 2). Also consistent with the proposed role of HY5 as an inducer of *PSY* expression and carotenoid biosynthesis, mutant *hy5-2* plants showed significantly ($P < 0.05$) reduced levels of *PSY* transcripts (Fig. 2B) and carotenoids (Fig. 2C) under both W and W+FR compared with the wild type. But since wild-type and *hy5-2* plants had very similar responses to simulated shade in terms of hypocotyl elongation, *PSY* expression, and carotenoid accumulation (Fig. 2), we conclude that HY5 is not required for the developmental (i.e. hypocotyl elongation) or the metabolic (i.e. carotenoid biosynthesis) responses to our W+FR treatment. In particular, the described repression-activation module formed by PIFq and HY5 proteins might not be relevant to regulate *PSY* expression in response to W+FR.

PAR1 Is a Positive Regulator of *PSY* Gene Expression and Carotenoid Accumulation during the SAS

Besides HY5, other negative (i.e. antagonistic) regulators of PIF activity and SAS elongation responses are

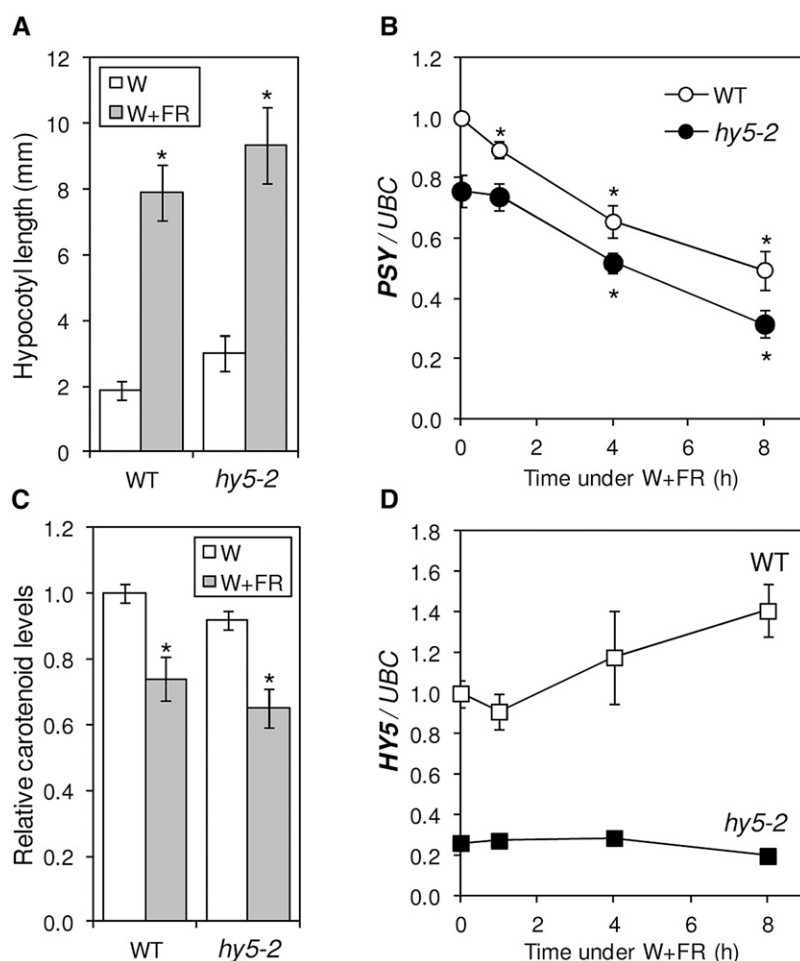
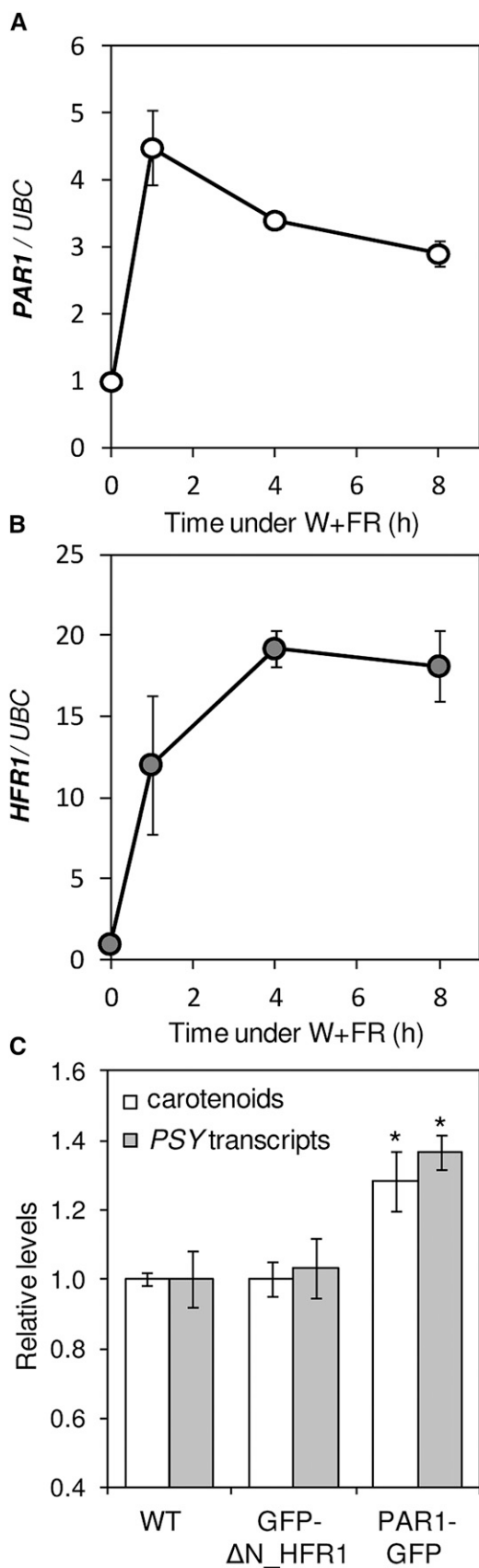


Figure 2. Contribution of HY5 to shade-triggered responses. A, Hypocotyl elongation response in wild-type (WT) and *hy5-2* seedlings grown for 2 d under W and then either kept in W (white bars) or transferred to W+FR (gray bars) for another 5 d. Hypocotyl length was measured using the ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/>) on digital images. Columns represent means and so of $n = 2$ independent experiments, each containing more than 30 seedlings of every genotype per treatment. B, qPCR analysis of *PSY* transcript levels in wild-type and *hy5-2* seedlings grown for 7 d under W and then treated with W+FR for the indicated times. C, Carotenoid levels in seedlings grown as described in A. The mean amount in W-grown wild-type samples was $105.74 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight. D, *HY5* transcript levels in the samples described in B. Values in B to D are shown relative to those in W-grown wild-type samples and correspond to means and so of biological triplicates ($n = 3$). Asterisks mark statistically significant differences ($P < 0.05$) relative to W-grown plants.



PAR1 and HFR1 (Sessa et al., 2005; Roig-Villanova et al., 2006, 2007; Hornitschek et al., 2009). But unlike *HY5* expression, which only slightly increases at late time points (8 h) following W+FR treatment (Ciolfi et al., 2013; Fig. 2D), the expression of *PAR1* and *HFR1* is induced soon (1 h) after exposure to low R:FR (Fig. 3). Under our experimental conditions, *PAR1* transcript levels peak early (1 h) after the W+FR treatment (Fig. 3A), similar to that observed for *PSY* transcripts in the *pifq* mutant (Fig. 1C), whereas *HFR1* expression increases steadily when plants are transferred to simulated shade (Fig. 3B). Interestingly, an increase in PAR1 activity in transgenic plants producing the PAR1-GFP fusion protein (Roig-Villanova et al., 2007) results in increased *PSY* transcript levels compared with untransformed plants (Fig. 3C). By contrast, no changes in *PSY* expression were observed when HFR1 function was up-regulated in lines producing a GFP-tagged version of a truncated HFR1 protein (here referred to as GFP-ΔN_HFR1) previously shown to be more stable than the full-length protein and highly active in vivo (Galstyan et al., 2011). Consistent with these results, analysis of carotenoid levels showed increased contents in plants with enhanced PAR1 levels, but not in those with higher HFR1 activity, relative to untransformed controls (Fig. 3C). Therefore, we conclude that *PSY* gene expression and carotenoid biosynthesis are positively regulated by PAR1 but not by HFR1. When exposed to simulated shade, lines overproducing PAR1-GFP showed no changes in carotenoid levels and a strongly attenuated down-regulation of *PSY* transcript levels (Fig. 4). These results confirm a positive role for PAR1 in the regulation of *PSY* gene expression and carotenoid accumulation during the SAS. Moreover, the similar carotenoid-related phenotypes observed in lines with down-regulated PIFq levels (*pifq* mutant) or up-regulated PAR1 levels (PAR1-GFP-overexpressing lines) compared with the wild-type controls (compare Figs. 1 and 4) further supports the conclusion that PAR1 and PIFq proteins antagonistically contribute to the control of carotenoid accumulation both under normal light conditions and in response to shade. This antagonistic effect, however, was not observed in the dark (Supplemental Fig. S1). Comparison of carotenoid

Figure 3. Contribution of PAR1 and HFR1 to the control of *PSY* expression and carotenoid biosynthesis. A, Levels of *PAR1* transcripts quantified by qPCR analysis of RNA samples from wild-type seedlings grown for 7 d under W and then treated for the indicated times with W+FR. B, Levels of *HFR1* transcripts in the samples described in A. Values in A and B are represented relative to those before the simulated shade treatment (0 h). Average and sd values of $n = 3$ independent samples are shown. C, Carotenoid levels (white bars) and *PSY* transcript abundance (gray bars) in plants producing the fusion proteins GFP-ΔN_HFR1 and PAR1-GFP and in wild-type controls (WT) grown under W for 7 d. Values are shown relative to those in wild-type samples (the mean carotenoid amount was $112.84 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight) and correspond to means and sd of $n = 3$ independent samples. Asterisks mark statistically significant differences ($P < 0.05$) relative to wild-type plants.

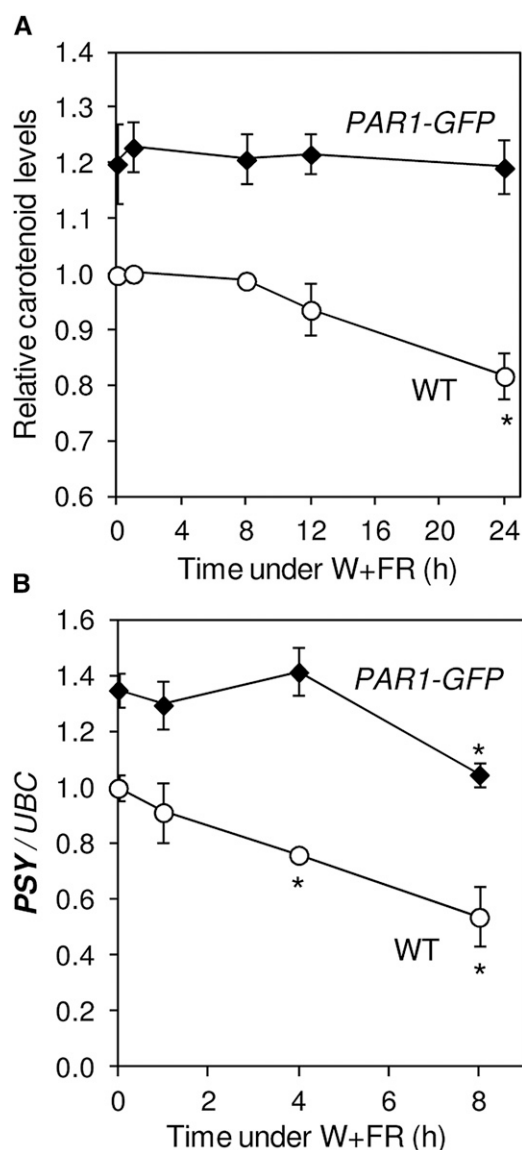


Figure 4. Carotenoid accumulation and *PSY* expression in plants with increased *PAR1* levels. A, Carotenoids measured in wild-type (WT) plants and transgenic lines overexpressing a GFP-tagged *PAR1* protein (*PAR1*-GFP). Plants were grown for 7 d under W and then treated with W+FR for the indicated times. The mean carotenoid level in W-grown wild-type plants was $105.17 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight. B, *PSY* transcript levels quantified by qPCR analysis of RNA samples from the plants described in A. Values are shown relative to those in W-grown wild-type samples and correspond to means and SD of $n = 3$ experiments. Asterisks mark statistically significant differences ($P < 0.05$) relative to W-grown plants.

levels in etiolated seedlings of wild-type, *pifq*, and *PAR1*-GFP-overexpressing lines showed wild-type levels in the transgenic seedlings, whereas the absence of *PIFq* proteins in the mutant resulted in increased carotenoid levels, as reported previously (Toledo-Ortiz et al., 2010). A possible explanation is that, opposite to *PIFq* proteins, *PAR1*-GFP is degraded in darkness (Zhou et al., 2014).

PAR1 Can Interact with PIF1 and Prevent Its Binding to the *PSY* Promoter to Directly Induce Gene Expression

Both *PAR1* and *HFR1* directly regulate gene expression by heterodimerizing with true bHLH transcription factors such as PIFs to prevent their binding to the promoters of target genes (Hornitschek et al., 2009; Carretero-Paulet et al., 2010; Galstyan et al., 2011; Hao et al., 2012; Cifuentes-Esquivel et al., 2013; Shi et al., 2013). In particular, *HFR1* has been shown to interact with *PIF1* and *PIF3* in vitro and in the yeast two-hybrid (Y2H) assay (Fairchild et al., 2000; Bu et al., 2011), whereas coimmunoprecipitation and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays demonstrated its interaction with *PIF1*, *PIF4*, and *PIF5* in vivo (Hornitschek et al., 2009; Shi et al., 2013). *PAR1* was recently shown to bind to *PIF4* in vivo to prevent its binding to DNA for transcriptional activity (Hao et al., 2012). To test whether *PAR1* could also interact with *PIF1*, the main repressor of *PSY* (Toledo-Ortiz et al., 2010), we carried out two complementary assays, Y2H and BiFC, using *HFR1* as a positive control (Fig. 5; Supplemental Fig. S2). The Y2H assay showed a clear interaction between *PAR1* and *PIF1* (Fig. 5A), whereas BiFC experiments performed by microbombarding leek (*Allium ampeloprasum*) epidermal cells confirmed that *PAR1* binds *PIF1* in the nucleus (Fig. 5B). Together, these results show that *PAR1* can physically interact with *PIF1* in vivo.

To next determine whether the interaction of *PAR1* and *PIF1* could modulate *PSY* expression in response to shade, chromatin immunoprecipitation assays were carried out using double transgenic *Arabidopsis* lines constitutively producing the fusion proteins *PAR1*-GR and *TAP*-*PIF1* (Fig. 6). *PAR1*-GR, a fusion of *PAR1* to the glucocorticoid receptor (GR), was previously shown to be biologically active when targeted to the nucleus upon treatment of transgenic plants with dexamethasone (DEX), a synthetic glucocorticoid (Roig-Villanova et al., 2007; Fig. 6A). The *TAP*-*PIF1* protein contains a tandem affinity purification (TAP) tag with nine copies of the MYC repeat that allows immunoprecipitation of *PIF1*-bound chromatin regions using an anti-MYC serum (Toledo-Ortiz et al., 2010, 2014). After germination and growth for 2 d under W, double transgenic seedlings were either left under W or exposed to W+FR for another 5 d in the presence or absence of DEX. At day 7, samples were collected and protein-DNA complexes formed by *TAP*-*PIF1* were immunoprecipitated. Enriched DNA sequences were then quantified by qPCR using primers that amplified the *PIF1* target sequence on the *PSY* promoter (Toledo-Ortiz et al., 2010). As shown in Figure 6B, W+FR treatment resulted in a higher ($P < 0.05$) proportion of immunoprecipitated *PIF1*-bound *PSY* promoter sequences. Therefore, it is likely that an enhanced accumulation of the *PIF1* protein under simulated shade conditions results in enhanced binding to the *PSY* promoter. Moreover, treatment with both W+FR and DEX caused a reduction in the level of immunoprecipitated *PSY* promoter sequences compared

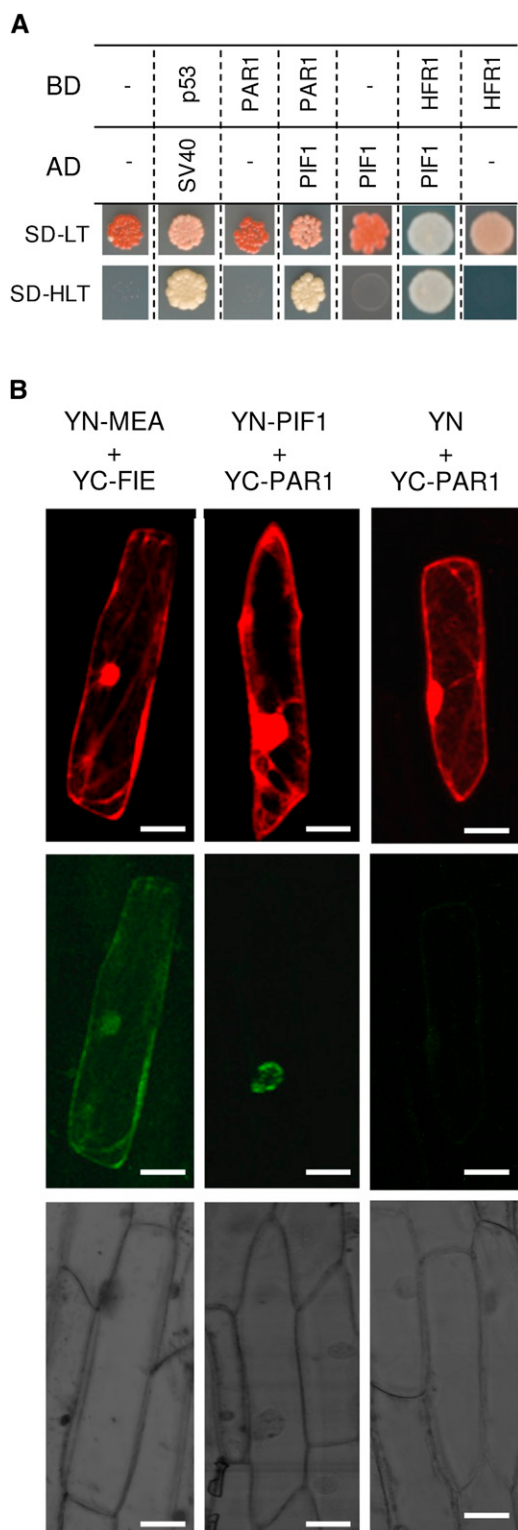


Figure 5. Interaction of PAR1 with PIF1 in vivo. A, Y2H assay of the indicated proteins fused to the activation domain (AD) or the binding domain (BD) of GAL4. Mating cells (positive transformants) were selected on synthetically defined medium (SD) lacking Leu and Trp (SD-LT), whereas protein-protein interactions were assessed on medium that also lacked His (SD-HLT). Proteins p53 and SV40 are known to interact

with samples treated only with W+FR (Fig. 6B). These results show that increased PAR1 levels in the nucleus interfere with PIF1 binding to the *PSY* promoter (Fig. 6A). Because PIF1 is a repressor of *PSY* expression (Toledo-Ortiz et al., 2010), PAR1 would then act as a positive regulator of *PSY* expression, consistent with the increased levels of *PSY* transcripts observed in light-grown PAR1-GFP-overexpressing lines (Figs. 3C and 4B).

To further confirm that PAR1 directly activates *PSY* expression by preventing the binding of transcriptional repressors like PIF1 and likely other PIFq proteins to the promoter, we used transgenic *Arabidopsis* lines producing the PAR1-GR protein in a genetic background in which PIFq proteins were either present (wild type) or absent (*pifq*). As shown in Figure 6C, treatment of W-grown PAR1-GR seedlings with DEX for 4 h resulted in a significant ($P < 0.05$) increase in *PSY* transcript levels compared with untreated plants, whereas no changes were detected in *pifq* PAR1-GR seedlings. This result confirms that *PSY* expression can be up-regulated when PAR1 levels increase in the nucleus and that this response requires the presence of PIFq proteins. Moreover, treatment of PAR1-GR plants with the protein synthesis inhibitor cycloheximide had no effect on the DEX-mediated increase of *PSY* transcript levels (Fig. 6C). Together, our data support the conclusion that PAR1 directly activates *PSY* gene expression by forming heterodimers with PIF1 and likely other PIFq proteins that repress *PSY* expression, hence preventing the binding of these transcription factors to their target sequences in the *PSY* promoter (Fig. 6A).

Specific Interactions of PAR1 and HFR1 with Distinct Subsets of Transcription Factors Might Control Different SAS Responses

Because both PAR1 and HFR1 can bind to PIF1 (Fig. 5; Supplemental Fig. S2) and other PIFq proteins but only PAR1 regulates *PSY* gene expression and carotenoid biosynthesis in plants (Fig. 3C), it can be speculated that the PAR1-PIF and HFR1-PIF interaction modules might somehow unleash different signaling pathways that eventually regulate common sets of responses (such as those causing hypocotyl elongation) but also specific ones (like carotenoid biosynthesis). It is also possible that

and were used as a positive control. B, BiFC assay of the indicated proteins fused to the N-terminal domain (YN) or the C-terminal domain (YC) of yellow fluorescent protein (YFP). Leek cells were cotransformed with plasmids to express the indicated fusion proteins and an additional vector producing the DsRed protein as a marker of cells expressing the microbombarded constructs. The top row shows the DsRed fluorescence, the middle row shows the fluorescence of reconstituted YFP (indicative of a positive interaction of YN and YC fusions), and the bottom row shows the bright-field images of the same area. Proteins MEA and FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE), known to interact in both the nucleus and the cytoplasm of plant cells (Bracha-Drori et al., 2004), were used as a positive control. A negative empty plasmid control is also shown in the right column. Additional controls are shown in Supplemental Figure S2. Bars = 20 μ m.

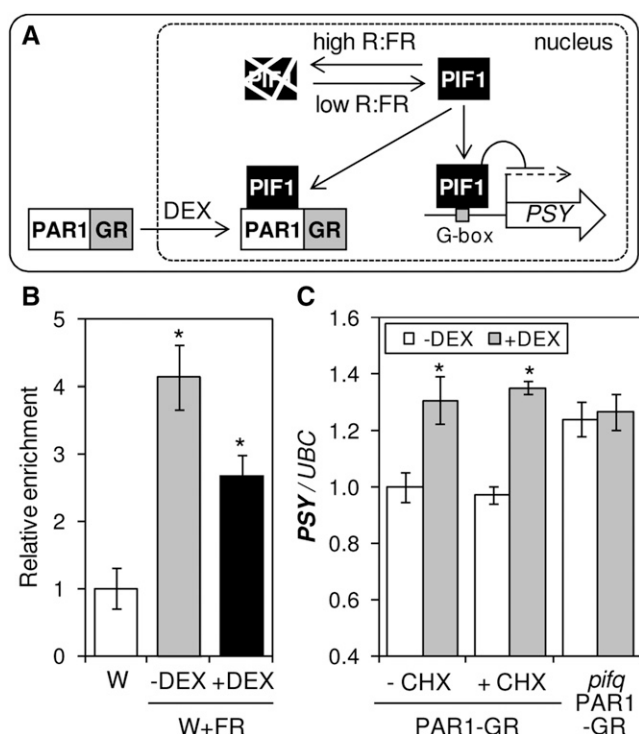


Figure 6. PAR1 is a direct positive regulator of *PSY* expression. **A**, Proposed model for the direct regulation of *PSY* gene expression by PIF1 and PAR1. PIF1 is unstable under high R:FR (W) but accumulates under low R:FR achieved by simulated shade (W+FR) treatment, eventually binding to the *PSY* promoter to repress it. However, when PAR1 levels are high (e.g. when nuclear translocation of the chimeric PAR1-GR protein is promoted by DEX treatment), interaction with PIF1 prevents its binding to the promoter and *PSY* expression increases. **B**, Chromatin immunoprecipitation assay of the influence of PAR1 on PIF1 binding to the *PSY* promoter. Double transgenic lines producing the fusion proteins TAP-PIF1 and PAR1-GR were grown for 2 d under W and then either left under W (white column) or exposed to W+FR for another 5 d in the presence (black column) or absence (gray column) of DEX. Chromatin immunoprecipitation was carried out using an anti-MYC antibody recognizing the tandem affinity purification tag. A nonantibody control sample was processed in parallel in each case. Immunoprecipitated DNA was analyzed by qPCR using specific primers covering the PIF1-binding motif in the *PSY* promoter. Results are represented relative to W-grown samples after normalization with the nonantibody control. Columns represent means and SD of biological triplicates. **C**, Single transgenic plants expressing only the PAR1-GR fusion in a wild-type or a PIF-defective (*ptf*) background were grown for 7 d under W and then treated (+) with DEX, cycloheximide (CHX), and/or mock solutions (–). Samples were collected 4 h after treatment to quantify *PSY* transcript levels. Values are shown relative to those in mock-treated PAR1-GR (wild-type) samples and correspond to means and SD of biological triplicates ($n = 3$). Asterisks mark statistically significant differences ($P < 0.05$) relative to mock samples.

PAR1 and HFR1 might differentially interact with other bHLH transcription factors that could further contribute to provide the observed specificity in terms of SAS responses. As a first step to understand the molecular mechanism behind the differential role of PAR1 and HFR1 on the regulation of *PSY* expression and carotenoid biosynthesis, we aimed to compare the profiles of

transcription factors that could potentially interact with these transcriptional cofactors. First, we searched for bHLH family proteins among those identified in a previous Y2H screening for PAR1-interacting partners (Cifuentes-Esquivel et al., 2013). As shown in Supplemental Table S1, 28 partners of PAR1 were found in eight of the 12 subfamilies described for bHLH proteins (Heim et al., 2003; Fig. 7). The interaction of PAR1 with individual members of subfamilies VII (PIF4 and HFR1), VIII (PAR1 and PAR2), and XII (BRASSINOSTEROID ENHANCED EXPRESSION1 [BEE1], BEE2, and BEE3) has been experimentally confirmed (Carretero-Paulet et al., 2010; Hao et al., 2012; Cifuentes-Esquivel et al., 2013). Additionally, previous work showed that PAR1 can also interact with other bHLH proteins not identified in this screen, including the atypical non-DNA-binding protein PACLOBUTRAZOL RESISTANCE1 (PRE1; Hao et al., 2012) and the subfamily V member BES1-INTERACTING MYC-LIKE1 (BIM1; Cifuentes-Esquivel et al., 2013), suggesting that the variety of bHLH targets of PAR1

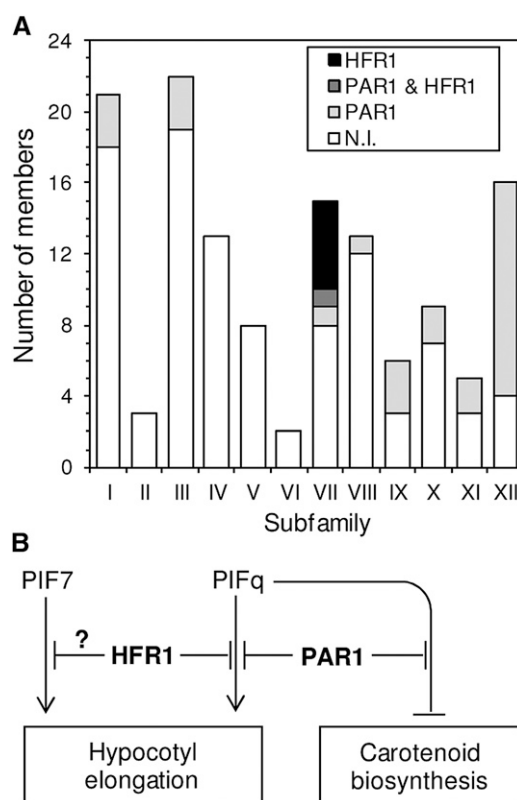


Figure 7. Differential roles for PAR1 and HFR1 during the SAS. **A**, Number of members of each bHLH subfamily found to interact with PAR1, HFR1, both transcription cofactors, and none of them (N.I.) in Y2H experiments. **B**, Model for antagonistic transcriptional modules regulating SAS responses. Low R:FR up-regulates the activity of transcription factors like PIF7 and PIFq and the expression of transcription cofactors like PAR1 and HFR1 (in boldface). Repression-activation modules formed by the indicated proteins thus modulate the induction of genes required for elongation growth and the repression of genes involved in carotenoid accumulation (including *PSY*).

action might be even wider than that unveiled by the Y2H screen.

A similar Y2H screening for HFR1-interacting partners identified only six bHLH proteins, all of them belonging to subfamily VII (Supplemental Table S2). They include all four PIFq proteins, previously shown to be able to heterodimerize with HFR1 (Fairchild et al., 2000; Hornitschek et al., 2009; Bu et al., 2011; Shi et al., 2013). Y2H screenings identified only one bHLH protein (PIF5) as a common target for PAR1 and HFR1 (Fig. 7A). However, other PIFq proteins (PIF1 and PIF4) have been found to also be able to interact with both transcriptional cofactors (Hornitschek et al., 2009; Hao et al., 2012; Shi et al., 2013; Fig. 5; Supplemental Fig. S2). Nevertheless, the results suggest that HFR1 might be much more target specific than PAR1. The observation that HFR1 appears to preferentially bind PIFs (i.e. members of its own subfamily) whereas PAR1 interacts with PIFs but also with a wide variety of other bHLH proteins (Fig. 7A) suggests that the impact on *PSY* expression and carotenoid accumulation caused by increasing the levels of PAR1 (but not HFR1) might be further mediated by non-PIF bHLH transcription factors that interact with PAR1 but not with HFR1. Consistent with this conclusion, the peak in *PAR1* gene expression observed early (1 h) after W+FR treatment (Fig. 3A) correlates with a similar up-regulation of *PSY* transcript levels in the absence of PIFq proteins (i.e. in the *pifq* mutant; Fig. 1C). Identifying specific non-PIFq *PSY* repressors antagonized by PAR1 upon heterodimerization, however, will require further work.

CONCLUSION

Our data show that PIFq proteins (but not PIF7) are repressors of *PSY* expression and carotenoid biosynthesis both under W and in response to shade (Fig. 1). Besides stimulating PIF activity, low R:FR perception results in a strong up-regulation of genes coding for SAS antagonists, including the transcription cofactors PAR1 and, later, HFR1 (Sessa et al., 2005; Roig-Villanova et al., 2006, 2007; Hornitschek et al., 2009). HFR1 does not appear to regulate *PSY* expression or carotenoid biosynthesis (Fig. 3). By contrast, PAR1 promotes carotenoid biosynthesis and directly induces *PSY* expression (Fig. 4), most likely by forming nonfunctional heterodimers with PIFq proteins such as PIF1 (Figs. 5 and 6) and, perhaps, with other bHLH transcription factors that might act as *PSY* repressors (Fig. 7A). The fast and transient up-regulation of *PAR1* expression that takes place after simulated shade exposure (Fig. 3A), therefore, might act as an early break to prevent an excessive reduction in *PSY* expression, allowing the plant to rapidly resume carotenoid biosynthesis if the low R:FR signal disappears (e.g. if a commitment to the shade-avoidance lifestyle is unnecessary). If the low R:FR signal persists, carotenoid accumulation decreases independently of *PSY* expression (Fig. 1). Our results with the *hy5-2* mutant suggest that the antagonistic PIFq-HY5 module

previously described to control *PSY* expression and carotenoid biosynthesis in response to environmental (light and temperature) signals (Toledo-Ortiz et al., 2014) might not be relevant during the SAS. Consistently, PAR1 and HY5 have been shown to act in separate pathways to inhibit hypocotyl elongation under different light conditions (Zhou et al., 2014).

Our data further suggest that specific modules of bHLH family members might control different sets of SAS-associated responses (Fig. 7B). Thus, PIF7 and HFR1 are key regulators of shade-induced elongation responses (Sessa et al., 2005; Li et al., 2012) but have no apparent role in regulating carotenoid biosynthesis, whereas PIFq and PAR1 proteins regulate both SAS responses. We propose that activation-suppression transcriptional modules formed by PAR1-PIFq proteins likely exert a dynamic control of early events in the regulation of both hypocotyl growth and carotenoid biosynthesis in response to low R:FR, whereas HFR1-PIFq and potentially HFR1-PIF7 modules might specifically control elongation responses (Fig. 7B). The lack of correlation between shade-induced hypocotyl elongation and flowering initiation in over 100 Arabidopsis ecotypes (Botto and Smith, 2002) previously supported the conclusion that different signaling pathways control distinct SAS responses (Martinez-Garcia et al., 2010). The results presented here, however, go a step beyond by highlighting the coexistence of different shade signaling pathways controlling several SAS responses (hypocotyl elongation and carotenoid accumulation) at the very same stage of development (photosynthetic seedlings).

In summary, we conclude that different modules formed by activators and repressors are recruited to regulate *PSY* expression and eventually carotenoid biosynthesis in response to low R:FR. Some of them regulate other responses to the same signal (e.g. the PAR1-PIFq module also controls hypocotyl elongation in response to shade). Most strikingly, individual module components do not always regulate carotenoid biosynthesis in other developmental stages (e.g. PAR1 does not appear to control carotenoid production in etiolated seedlings; Supplemental Fig. S1) or in response to different stimuli (e.g. the burst in *PSY* transcript accumulation that takes place in Arabidopsis roots exposed to a salt stress does not require the activity of PIFq proteins; Ruiz-Sola et al., 2014). Future work should help to unveil the complexity underlying the control of carotenoid biosynthesis in order to better understand and manipulate the carotenoid profiles of particular tissues in response to specific treatments.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Growth Conditions

All the Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) lines used in this work are in the Columbia background. Transgenic lines producing PAR1-GFP, PAR1-GR, and GFP-ΔN_HFR1 have been described previously (Roig-Villanova et al., 2007; Galst'yan et al., 2011). Double transgenic lines producing PAR1-GR and TAP-PIF1

proteins were generated by crossing the corresponding single transgenic lines (Roig-Villanova et al., 2007; Toledo-Ortiz et al., 2010). Single *pif7-2* (Leivar et al., 2008a) and quadruple *pifq* (Leivar et al., 2008b) mutants were also available in the laboratory. The *pifq* PAR1-GFP lines were constructed by transforming *pifq* plants with the PAR1-GR construct (Roig-Villanova et al., 2007). A DEX-responsive homozygous *pifq* PAR1-GFP line displaying PAR1-GR transcript levels similar to those in the original PAR1-GR line (in a wild-type background) was selected for the experiments. The SALK_056405 line (here referred to as *hy5-2*), previously shown to be a knockout mutant (Oh and Montgomery, 2013), was obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre.

Seeds were surface sterilized and sown on petri dishes with solid growth medium without Suc (Roig-Villanova et al., 2007). When comparing different lines (e.g. wild type versus mutant), they were grown together on the same plate instead of growing each line on a different plate. After stratification for at least 3 d at 4°C in the dark, the plates were incubated in growth chambers at 22°C under continuous W (25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) photosynthetically active radiation, R:FR of 2.1–3.5). Simulated shade (W+FR; 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetically active radiation, R:FR of 0.05) was generated by enriching W with supplementary far-red light provided by QB1310CS-670-735 light-emitting diode hybrid lamps (Quantum Devices). Fluence rates were measured using an EPP2000 spectrometer (StellarNet) as described (Sorin et al., 2009). For experiments involving pharmacological treatments, seeds were germinated and grown under W on sterile filter paper placed on top of solid growth medium in petri dishes. At the indicated time, the filter paper with the seedlings was transferred to fresh plates containing cycloheximide and/or DEX as described (Roig-Villanova et al., 2007). For seed production, plants were grown in the greenhouse under long-day conditions.

Quantification of Transcript and Carotenoid Levels

Whole seedlings were ground in liquid nitrogen, and part of the resulting powder was used for the quantification of carotenoid levels by HPLC or spectrometric methods as described (Rodríguez-Villalón et al., 2009). HPLC separation and quantification of carotenoids and chlorophylls were performed in an initial set of experiments. Once confirmed that all individual carotenoids showed similar responses to simulated shade (Supplemental Fig. S1), total carotenoid levels were estimated spectrophotometrically (Lichtenthaler, 1987). Concentration was calculated relative to fresh weight. The rest of the powder was used for RNA extraction using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). The synthesis of complementary DNA (cDNA) from DNase-treated RNA was carried out using the Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). The qPCR experiments were performed as described (Rodríguez-Villalón et al., 2009) using Fast Start Universal SYBR Green Master Mix (Roche) on a Light Cycler 480 apparatus (Roche). The *UBC* (At5g25760) gene was used for normalization (Czechowski et al., 2005). Primer sequences for qPCR are listed in Supplemental Table S3. Two-tailed Student's *t* tests were performed to analyze statistical differences.

Protein-DNA and Protein-Protein Interaction Analyses

Chromatin immunoprecipitation assays were carried out as described (Toledo-Ortiz et al., 2014). The Y2H screen using HFR1 as a bait was performed by Hybrigenics (www.hybrigenics-services.com) as described previously for PAR1 (Cifuentes-Esquivel et al., 2013). Briefly, the coding sequence for HFR1 was cloned into pB27 as a C-terminal fusion to LexA, and the resulting construct (pB27-LexA-HFR1) was used as a bait to screen a random-primed Arabidopsis cDNA library from 7-d-old wild-type seedlings grown at 24°C under a long-day photoperiod. Screening of 76.6 million clones was carried out using a mating approach, and positive clones were used to sequence the corresponding prey inserts by PCR. Supplemental Tables S1 and S2 summarize the results for bHLH proteins found to interact with PAR1 and HFR1, respectively, including a confidence score (predicted biological score) attributed to each interaction.

Individual Y2H assays were performed by cell mating with the Matchmaker system (Clontech). Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells of two different strains, the *MATa* Leu auxotroph YM4271a (Liu et al., 1993) and the *MATα* Trp auxotroph PJ694α (Uetz et al., 2000), were transformed with constructs to express fusion proteins to either the GAL4 activation domain (AD) or binding domain (BD), respectively, and selected in appropriate medium. PIF1 was fused to the activation domain by subcloning the full-length *PIF1* cDNA into the pGADT7 plasmid, yielding pJB62 [AD-PIF1]. A BD-PAR1 fusion in plasmid pCL1 was available (Galstyan et al., 2011), whereas a similar construct was generated for HFR1 by subcloning the full-length *HFR1* cDNA into the pGBKT7 plasmid to

yield pJB37 [BD-HFR1]. Independent transformants were selected on SD lacking either Leu (pJB62) or Trp (pCL1 and pJB37), grown in liquid medium, and then allowed to mate by mixing equal volumes of the two types of transformed yeast cells. Mated cells were selected on SD-Leu-Trp and then transferred to SD-His-Leu-Trp to test for protein-protein interaction. Mating was repeated at least twice, with identical results.

For BiFC experiments, cDNA sequences encoding PIF1, PAR1, and HFR1 proteins were fused to the N-terminal or C-terminal regions of YFP using appropriate vectors (Bracha-Drori et al., 2004). The full-length *PIF1* cDNA was cloned into pSY736 to yield pJB72 [YN-PIF1]. Plasmid pSY735 was used to construct vectors pMS2 [YC-PAR1] and pCN6 [YC-HFR1] as described (Cifuentes-Esquivel et al., 2013). Leek (*Allium ampeloprasum*) epidermal peels were microbombarded with DNA-coated gold microcarriers using a Biolistic PDS-1000/helium system (Bio-Rad) and incubated at 22°C in the dark for 24 h prior to observation with an Olympus FV1000-ASW confocal laser scanning microscope.

Supplemental Data

The following supplemental materials are available.

Supplemental Figure S1. HPLC profiles and quantification of carotenoid and chlorophyll pigments.

Supplemental Figure S2. BiFC assay of the interaction of HFR1 and PIF1.

Supplemental Table S1. PAR1-interacting bHLH proteins identified in the Y2H screen.

Supplemental Table S2. HFR1-interacting bHLH proteins identified in the Y2H screen.

Supplemental Table S3. Primers used in this work for qPCR analyses.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Nottingham Arabidopsis Stock Centre for seeds from mutant lines, Dr. Luis Oñate for Y2H yeast strains, and M. Rosa Rodríguez-Goberna and members of the Centre for Research in Agricultural Genomics Services for technical support.

Received April 13, 2015; accepted June 16, 2015; published June 16, 2015.

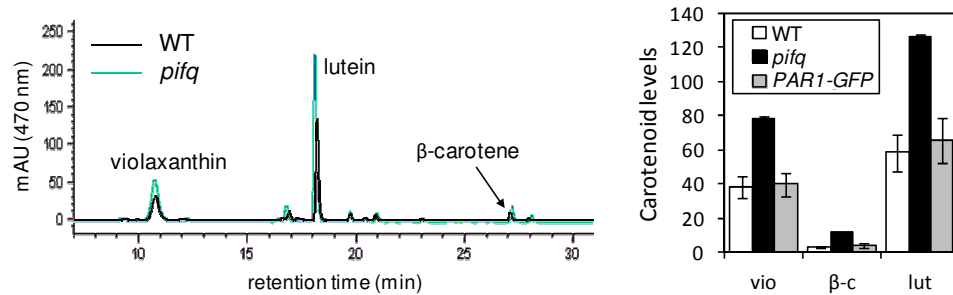
LITERATURE CITED

- Botto JH, Smith H (2002) Differential genetic variation in adaptive strategies to a common environmental signal in Arabidopsis accessions: phytochrome-mediated shade avoidance. *Plant Cell Environ* 25: 53–63
- Bracha-Drori K, Shichrur K, Katz A, Oliva M, Angelovici R, Yalovsky S, Ohad N (2004) Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* 40: 419–427
- Bu Q, Castillon A, Chen F, Zhu L, Huq E (2011) Dimerization and blue light regulation of PIF1 interacting bHLH proteins in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 77: 501–511
- Carretero-Paulet L, Galstyan A, Roig-Villanova I, Martínez-García JF, Bilbao-Castro JR, Robertson DL (2010) Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in Arabidopsis, poplar, rice, moss, and algae. *Plant Physiol* 153: 1398–1412
- Casal JJ (2013) Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. *Annu Rev Plant Biol* 64: 403–427
- Chen D, Xu G, Tang W, Jing Y, Ji Q, Fei Z, Lin R (2013) Antagonistic basic helix-loop-helix/bZIP transcription factors form transcriptional modules that integrate light and reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25: 1657–1673
- Cifuentes-Esquivel N, Bou-Torrent J, Galstyan A, Gallemí M, Sessa G, Salla Martret M, Roig-Villanova I, Ruberti I, Martínez-García JF (2013) The bHLH proteins BEE and BIM positively modulate the shade avoidance syndrome in Arabidopsis seedlings. *Plant J* 75: 989–1002
- Ciolfi A, Sessa G, Sassi M, Possenti M, Salvucci S, Carabelli M, Morelli G, Ruberti I (2013) Dynamics of the shade-avoidance response in Arabidopsis. *Plant Physiol* 163: 331–353
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol* 139: 5–17

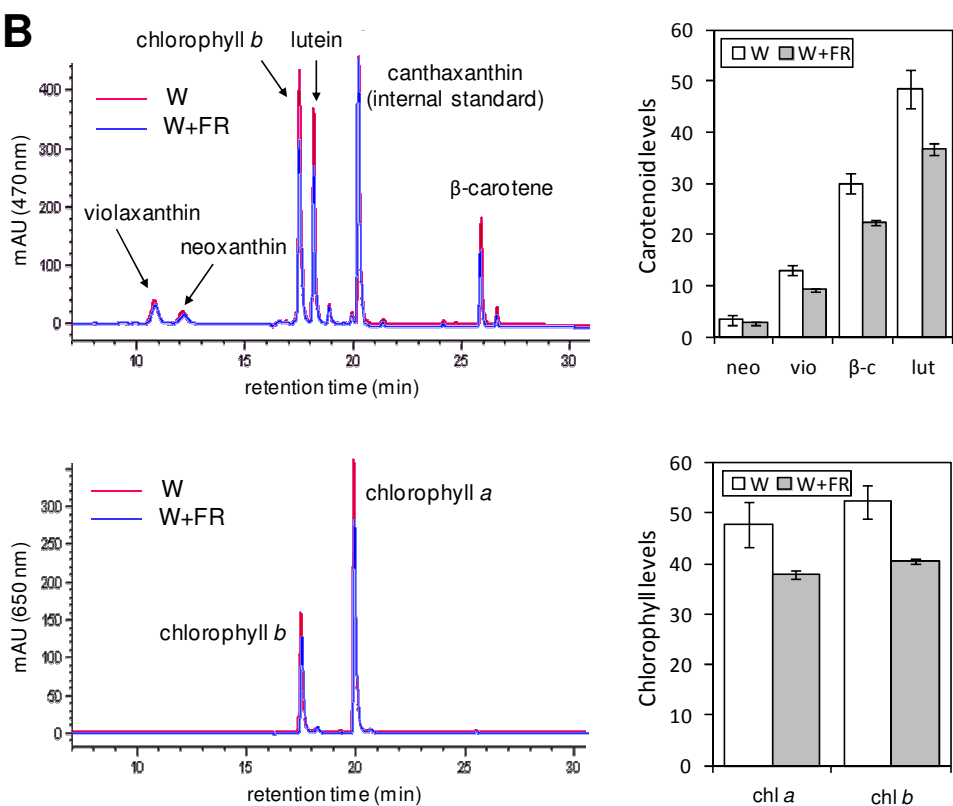
- Domonkos I, Kis M, Gombos Z, Ughy B (2013) Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Prog Lipid Res* 52: 539–561
- Fairchild CD, Schumaker MA, Quail PH (2000) HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev* 14: 2377–2391
- Franklin KA (2008) Shade avoidance. *New Phytol* 179: 930–944
- Galstyan A, Bou-Torrent J, Roig-Villanova I, Martínez-García JF (2012) A dual mechanism controls nuclear localization in the atypical basic-helix-loop-helix protein PAR1 of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 5: 669–677
- Galstyan A, Cifuentes-Esquivel N, Bou-Torrent J, Martínez-García JF (2011) The shade avoidance syndrome in *Arabidopsis*: a fundamental role for atypical basic helix-loop-helix proteins as transcriptional co-factors. *Plant J* 66: 258–267
- Gommers CM, Visser EJ, St Onge KR, Voesenek LA, Pierik R (2013) Shade tolerance: when growing tall is not an option. *Trends Plant Sci* 18: 65–71
- Hao Y, Oh E, Choi G, Liang Z, Wang ZY (2012) Interactions between HLH and bHLH factors modulate light-regulated plant development. *Mol Plant* 5: 688–697
- Heim MA, Jakoby M, Werber M, Martin C, Weisshaar B, Bailey PC (2003) The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol Biol Evol* 20: 735–747
- Hornitschek P, Kohnen MV, Lorrain S, Rougemont J, Ljung K, López-Vidriero I, Franco-Zorrilla JM, Solano R, Trevisan M, Praderwand S, et al (2012) Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling. *Plant J* 71: 699–711
- Hornitschek P, Lorrain S, Zoete V, Michielin O, Fankhauser C (2009) Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers. *EMBO J* 28: 3893–3902
- Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, Fankhauser C (2010) Light-regulated plant growth and development. *Curr Top Dev Biol* 91: 29–66
- Lau OS, Deng XW (2010) Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Curr Opin Plant Biol* 13: 571–577
- Leivar P, Monte E, Al-Sady B, Carle C, Storer A, Alonso JM, Ecker JR, Quail PH (2008a) The *Arabidopsis* phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *Plant Cell* 20: 337–352
- Leivar P, Monte E, Oka Y, Liu T, Carle C, Castillon A, Huq E, Quail PH (2008b) Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Curr Biol* 18: 1815–1823
- Leivar P, Quail PH (2011) PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends Plant Sci* 16: 19–28
- Leivar P, Tepperman JM, Cohn MM, Monte E, Al-Sady B, Erickson E, Quail PH (2012) Dynamic antagonism between phytochromes and PIF family basic helix-loop-helix factors induces selective reciprocal responses to light and shade in a rapidly responsive transcriptional network in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 1398–1419
- Li L, Ljung K, Breton G, Schmitz RJ, Pruneda-Paz J, Cowing-Zitron C, Cole BJ, Ivans LJ, Pedmale UV, Jung HS, et al (2012) Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture. *Genes Dev* 26: 785–790
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* 148: 351–382
- Liu H, Styles CA, Fink GR (1993) Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* 262: 1741–1744
- Lorrain S, Allen T, Duek PD, Whitelam GC, Fankhauser C (2008) Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *Plant J* 53: 312–323
- Martínez-García JF, Galstyan A, Salla-Martret M, Cifuentes-Esquivel N, Gallemí M, Bou-Torrent J (2010) Regulatory components of shade avoidance syndrome. *Adv Bot Res* 53: 65–116
- Niyogi KK (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 333–359
- Oh S, Montgomery BL (2013) Phytochrome-induced SIG2 expression contributes to photoregulation of phytochrome signalling and photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 64: 5457–5472
- Patel D, Basu M, Hayes S, Majláth I, Hetherington FM, Tschaplinski TJ, Franklin KA (2013) Temperature-dependent shade avoidance involves the receptor-like kinase ERECTA. *Plant J* 73: 980–992
- Rodríguez-Villalón A, Gas E, Rodríguez-Concepción M (2009) Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* 60: 424–435
- Roig-Villanova I, Bou J, Sorin C, Devlin PF, Martínez-García JF (2006) Identification of primary target genes of phytochrome signaling: early transcriptional control during shade avoidance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141: 85–96
- Roig-Villanova I, Bou-Torrent J, Galstyan A, Carretero-Paulet L, Portolés S, Rodríguez-Concepción M, Martínez-García JF (2007) Interaction of shade avoidance and auxin responses: a role for two novel atypical bHLH proteins. *EMBO J* 26: 4756–4767
- Ruiz-Sola MA, Rodríguez-Concepción M (2012) Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colorful pathway. *The Arabidopsis Book* 10: e0158, doi/10.1199/tab.0158
- Ruiz-Sola MA, Rodríguez-Villalón A, Rodríguez-Concepción M (2014) Light-sensitive Phytochrome-Interacting Factors (PIFs) are not required to regulate phytoene synthase gene expression in the root. *Plant Signal Behav* 9: e29248
- Sellaro R, Pacin M, Casal JJ (2012) Diurnal dependence of growth responses to shade in *Arabidopsis*: role of hormone, clock, and light signaling. *Mol Plant* 5: 619–628
- Sellaro R, Yanovsky MJ, Casal JJ (2011) Repression of shade-avoidance reactions by sunfleck induction of HY5 expression in *Arabidopsis*. *Plant J* 68: 919–928
- Sessa G, Carabelli M, Sassi M, Ciolfi A, Possenti M, Mittempergher F, Becker J, Morelli G, Ruberti I (2005) A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 19: 2811–2815
- Shi H, Zhong S, Mo X, Liu N, Nezames CD, Deng XW (2013) HFR1 sequesters PIF1 to govern the transcriptional network underlying light-initiated seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25: 3770–3784
- Sorin C, Salla-Martret M, Bou-Torrent J, Roig-Villanova I, Martínez-García JF (2009) ATHB4, a regulator of shade avoidance, modulates hormone response in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* 59: 266–277
- Toledo-Ortiz G, Huq E, Rodríguez-Concepción M (2010) Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 11626–11631
- Toledo-Ortiz G, Johansson H, Lee KP, Bou-Torrent J, Stewart K, Steel G, Rodríguez-Concepción M, Halliday KJ (2014) The HY5-PIF regulatory module coordinates light and temperature control of photosynthetic gene transcription. *PLoS Genet* 10: e1004416
- Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, Lockshon D, Narayan V, Srinivasan M, Pochart P, et al (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403: 623–627
- Zhang Y, Mayba O, Pfeiffer A, Shi H, Tepperman JM, Speed TP, Quail PH (2013) A quartet of PIF bHLH factors provides a transcriptionally centered signaling hub that regulates seedling morphogenesis through differential expression-patterning of shared target genes in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 9: e1003244
- Zhou P, Song M, Yang Q, Su L, Hou P, Guo L, Zheng X, Xi Y, Meng F, Xiao Y, et al (2014) Both PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED1 (PAR1) and PAR2 promote seedling photomorphogenesis in multiple light signaling pathways. *Plant Physiol* 164: 841–852

Supplemental Figures

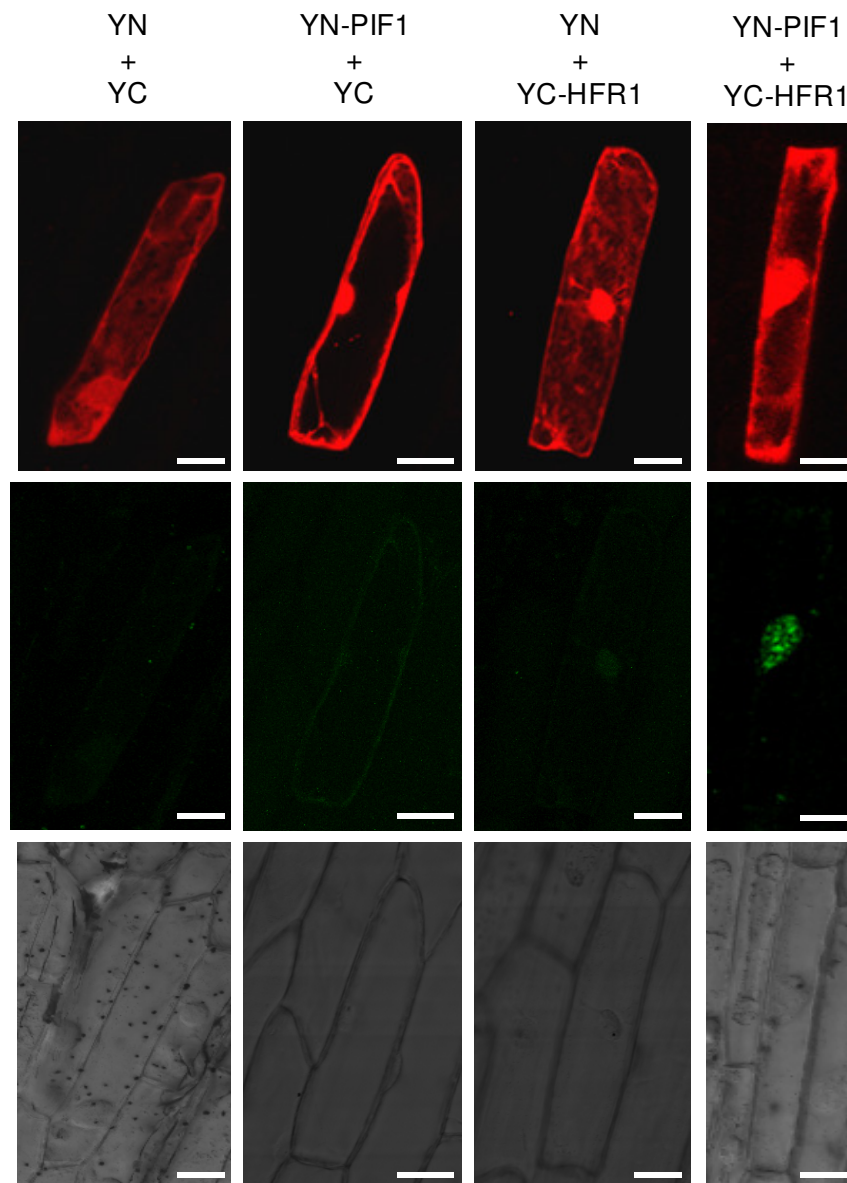
A



B



Supplemental Figure S1. HPLC profiles and quantification of carotenoid and chlorophyll pigments. (A) Transgenic plants overexpressing PAR1-GFP were germinated and grown for 3 days in the dark together with WT and *pifq* lines and then samples were collected for carotenoid extraction and HPLC analysis. Representative HPLC chromatograms (470 nm) of etiolated WT and *pifq* seedlings are shown. The graph shows the % of each individual carotenoid in the three genotypes relative to total carotenoid levels in WT samples. Data correspond to the mean and standard deviation of biological triplicates (n=3). (B) WT seedlings were grown for 2 days under W and then transferred to either W or W+FR conditions for 5 additional days. Samples were then collected for HPLC analysis of chlorophylls and carotenoids. Canthaxanthin, a carotenoid not found in plants, was used as an internal standard. HPLC chromatograms collected at 470 nm (carotenoids) and 650 nm (chlorophylls) are shown. The corresponding graphs show the % of individual carotenoids (upper graph) or chlorophylls (lower graph) relative to total levels of these pigments in W-grown samples. Mean and standard deviation of biological triplicates (n=3) are shown.



Supplemental Figure S2. BiFC assay of the interaction of HFR1 and PIF1. Leek cells were co-bombarded with plasmids to express the indicated fusion proteins to the N-terminal (YN) or C-terminal (YC) domains of YFP or/and with empty vectors together with a construct producing the DsRed protein as a marker of microbombarded cells. The upper row shows the DsRed fluorescence, the central row shows the fluorescence of reconstituted YFP (indicative of a positive interaction of YN and YC fusions), and the lower row shows the bright-field images of the same area. Scale bars = 20 μ M.

Supplemental Tables

Supplemental Table S1. PAR1-interacting bHLH proteins identified in the Y2H screen.

AGI	Name	Family ⁽¹⁾	# Clones ⁽²⁾	Category ⁽³⁾
At1g73830	BHLH050 (BEE3)	XII	26	A
At2g42300	BHLH048	XII	15	A
At3g57800	BHLH060	XII	6	A
At4g36540	BHLH058 (BEE2)	XII	6	A
At5g48560	BHLH078	XII	16	A
At3g24140	BHLH097 (FAMA)	I	3	B
At5g53210	BHLH098 (SPEECHLESS)	I	7	B
At1g02340	BHLH026 (HFR1)	VII	4	B
At4g29100	BHLH068	X	4	B
At1g03040	BHLH007	XI	4	B
At4g30980	BHLH069	XI	6	B
At1g10120	BHLH074	XII	7	B
At1g18400	BHLH044 (BEE1)	XII	8	B
At1g62975	BHLH125	I	4	D
At1g12860	BHLH033	III	1	D
At2g28160	BHLH029 (FIT/FRU)	III	3	D
At5g57150	BHLH035	III	1	D
At3g59060	BHLH065 (PIF5/PIL6) ^{(4) (5)}	VII	2	D
At4g33880	BHLH085	VIII	1	D
At4g09180	BHLH081	IX	1	D
At3g20640	BHLH123 (NAN)	X	1	D
At2g18300	BHLH064	XII	2	D
At3g07340	BHLH062	XII	1	D
At1g05805	BHLH128	IX	3	N/A
At1g35460	BHLH080	IX	3	N/A
At1g68920	BHLH049	XII	1	N/A
At3g23690	BHLH077	XII	7	N/A
At5g62610	BHLH079	XII	1	N/A

(1) According to Heim et al., 2003.

(2) Number of positive clones (with a complete or a partial sequence) identified in the screen.

(3) Hybrigenics Global PBS Category:

A, Very high confidence in the interaction

B, High confidence in the interaction

D, Moderate confidence in the interaction

N/A, PBS score cannot be attributed

(4) Found to interact with HFR1 in this work.

(5) Found to interact with HFR1 by Hornitschek et al., 2009.

Supplemental Table S2. HFR1-interacting bHLH proteins identified in the Y2H screen.

AGI	Name	Family ⁽¹⁾	# Clones ⁽²⁾	Category ⁽³⁾
At1g09530	BHLH008 (PIF3)	VII	1	N/A
At2g20180	BHLH015 (PIF1/PIL5) ⁽⁴⁾	VII	14	A
At2g43010	BHLH009 (PIF4) ⁽⁵⁾	VII	19	A
At3g59060	BHLH065 (PIF5/PIL6) ⁽⁴⁾	VII	146	A
At3g62090	BHLH132 (PIF6/PIL2)	VII	2	D
At4g00050	BHLH016 (PIF8/UNE10)	VII	24	A

(1) According to Heim et al., 2003.

(2) Number of positive clones (with a complete or a partial sequence) identified in the screen.

(3) Hybrigenics Global PBS Category (see Table S1).

(4) Found to interact with PAR1 in this work.

(5) Found to interact with PAR1 by Hao et al., 2012.

Supplemental Table S3. Primers used in this work for qPCR analyses.

Gene	Primer	Sequence
At5g17230 (<i>PSY</i>)	TO34	GAC ACC CGA AAG GCG AAA GG
	TO35	CAG CGA GAG CAG CAT CAA GC
At5g11260 (<i>HY5</i>)	MOH5F	CAA GCA GCG AGA GGT CAT CA
	MOH5R	CAT CGC TTT CAA TTC CTT CTT TG
At2g42870 (<i>PAR1</i>)	BO109	CAC CGT CAT GCT CAG CCA
	BO110	TCG GTC TTC ACG TAC GCT TG
At1g02340 (<i>HFR1</i>)	BO89	GAT GCG TAA GCT ACA GCA ACT CGT
	BO90	AGA ACC GAA ACC TTG TCC GTC TT
At5g25760 (<i>UBC</i>)	TO42	CTG CTT GGA CGC TTC AGT CTG
	TO43	CGC AGT TAA GAG GAC TGT CC

RESEARCH ARTICLE

Differential Subplastidial Localization and Turnover of Enzymes Involved in Isoprenoid Biosynthesis in Chloroplasts

Catalina Perello¹, Ernesto Llamas¹, Vincent Burlat², Miriam Ortiz-Alcaide¹, Michael A. Phillips¹, Pablo Pulido^{1a}, Manuel Rodriguez-Concepcion^{1*}

1 Program of Plant Metabolism and Metabolic Engineering, Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG) CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain, **2** Université de Toulouse, CNRS, UMR 5546, BP 42617 Auzeville, 31326 Castanet-Tolosan, France

✉ Current address: Department Biology I—Botany, Ludwig Maximilian University of Munich, Grosshaderner Str. 2–4, D-82152 Planegg-Martinsried, Germany

* manuel.rodriguez@cragenomica.es



OPEN ACCESS

Citation: Perello C, Llamas E, Burlat V, Ortiz-Alcaide M, Phillips MA, Pulido P, et al. (2016) Differential Subplastidial Localization and Turnover of Enzymes Involved in Isoprenoid Biosynthesis in Chloroplasts. PLoS ONE 11(2): e0150539. doi:10.1371/journal.pone.0150539

Editor: Miguel A Blazquez, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, SPAIN

Received: September 9, 2015

Accepted: February 15, 2016

Published: February 26, 2016

Copyright: © 2016 Perello et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was funded by grants from Generalitat de Catalunya (2014SGR-1434), Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (BIO2014-59092-P and BIO2015-71703-REDT), and European Commission FP7 (TiMet, contract 245143) to MRC. CP and MOA received predoctoral fellowships from Spanish CSIC (JAE-PRE program) and MINECO (FPI program), respectively. EL is supported by a Mexican CONACYT predoctoral fellowship. The funders had no role in study design, data collection

Abstract

Plastidial isoprenoids are a diverse group of metabolites with roles in photosynthesis, growth regulation, and interaction with the environment. The methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway produces the metabolic precursors of all types of plastidial isoprenoids. Proteomics studies in *Arabidopsis thaliana* have shown that all the enzymes of the MEP pathway are localized in the plastid stroma. However, immunoblot analysis of chloroplast subfractions showed that the first two enzymes of the pathway, deoxyxylulose 5-phosphate synthase (DXS) and reductoisomerase (DXR), can also be found in non-stromal fractions. Both transient and stable expression of GFP-tagged DXS and DXR proteins confirmed the presence of the fusion proteins in distinct subplastidial compartments. In particular, DXR-GFP was found to accumulate in relatively large vesicles that could eventually be released from chloroplasts, presumably to be degraded by an autophagy-independent process. Together, we propose that protein-specific mechanisms control the localization and turnover of the first two enzymes of the MEP pathway in *Arabidopsis* chloroplasts.

Introduction

Plant chloroplasts are active metabolic machines that fix carbon using the energy of sunlight to produce myriad compounds that support plant growth and development and contribute to their environmental adaptation. The enzymes that participate in these metabolic pathways are typically encoded by genes in the nuclear genome and hence they must be imported into plastids for biological activity. Complexes at the outer and inner chloroplast envelope membranes import most plastidial proteins into the stroma [1]. After proteolytic removal of the N-terminal plastid targeting sequence, the mature proteins with additional targeting signals are further directed to specific subplastidial compartments, including thylakoid membranes and lumen [2,3]. When normal activity ceases or environmental challenges such as excess light, temperature peaks,

and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

oxidative stress or nutrient starvation render the proteins inactive, protein quality control systems ensure their refolding (i.e. reactivation) or degradation to prevent the formation of toxic protein aggregates and maintain protein homeostasis in the chloroplast [4–6].

Isoprenoids are one of the most diverse groups of plant metabolites and comprise a variety of compounds with remarkable economic interest as medicinal drugs, pigments, aromas, chemicals, nutrients, and biofuels [7]. Thanks to the presence of plastids, plant cells have not one but two pathways to produce isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP), the universal metabolic precursors of isoprenoids [7,8]. Fungal and animal cells produce these precursors by the exclusive operation of the mevalonate pathway, also used by plant cells to synthesize the building blocks of cytosolic and mitochondrial isoprenoids. In the plastid, however, the biochemically unrelated methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway is used for the production of IPP and DMAPP for plastidial isoprenoids that function in photosynthesis (chlorophylls, carotenoids, tocopherols, prenylquinones), growth regulation (gibberellins, cytokinins, abscisic acid, strigolactones), and interaction with the environment (isoprene, monoterpenes, diterpenes). Although the advantages for plants of retaining two pathways are not fully understood [9], it is possible that the physical separation of the pathways facilitates the optimal supply of the metabolic precursors required in each cell compartment. The first steps of the MEP pathway involve the production of MEP from pyruvate and glyceraldehyde 3-phosphate via deoxyxylulose 5-phosphate (DXP). Following these steps, catalyzed by the enzymes DXP synthase (DXS) and DXP reductoisomerase (DXR), MEP is converted into a mixture of IPP and DMAPP in five additional enzymatic steps [10–12].

All seven MEP pathway enzymes are encoded by nuclear genes and imported into plastids [10,13]. Proteomic studies have identified all of them in the stromal fraction [14]. Computational analyses, however, led to propose that DXS and DXR might be additionally targeted to the thylakoid membrane or lumen [15,16]. Overexpression of any of these two enzymes in plants often results in an enhanced accumulation of MEP-derived isoprenoids [17–22], supporting the conclusion that they are important control points over flux in the MEP pathway [12,23–25]. Consistent with this regulatory role, the levels of both DXS and DXR enzymes are tightly regulated at multiples levels beyond the control of gene expression [23,26,27], including degradation by the stromal Clp protease [28–30]. Analysis of transgenic *Arabidopsis thaliana* lines producing a GFP-fused version of the DXS protein (35S:DXS-GFP lines) helped to understand the post-translational control of enzyme distribution, levels and activity within the plastid [31]. Fluorescence corresponding to the DXS-GFP fusion protein showed a spotted distribution in chloroplasts, likely due to the formation of protein aggregates [30,31]. The subplastidial localization and degradation pathways of the DXR protein, however, have not been explored yet. In this study we provide experimental evidence that *Arabidopsis* DXS and DXR proteins follow distinct pathways for protein turnover, which in the case of DXR appears to involve the formation of likely non-autophagic vesicles.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions

All the *Arabidopsis thaliana* lines used in this work are in the Columbia background, including the *clpr1-2* mutant allele [28]. The line *pCAMBIA3300-PGL34-YFP* [32] was a kind gift of Felix Kessler (Université de Neuchâtel, Switzerland). Constructs 35S:DXS-GFP [31], 35S:DXR-GFP [31] and 35S:G11-GFP [33] were used for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis* plants. Homozygous lines containing a single T-DNA insertion were selected based on the segregation of the corresponding resistance marker. For experiments, seeds were surface-sterilized and sown on top of solid Murashige and Skoog (MS) medium (with no sucrose or

vitamins) in Petri dishes. After stratification for at least 2 days at 4°C in the dark, plates were transferred to growth chambers at 22°C and illuminated with fluorescent white light (photon fluence rate of 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) for 16h/day (long-day photoperiod, LD). When indicated, the medium was supplemented with fosmidomycin (Sigma) or concanamycin A (Sigma). For treatments with fosmidomycin, plants were germinated and grown on media supplemented with the inhibitor (50 μM). Fosmidomycin resistance was assayed as described [34]. For treatment with concanamycin A, plants were germinated and grown for 4 days under LD on MS medium. Then, individual seedlings were transferred to MS plates supplemented with 10 μM concanamycin A and incubated in the dark for 24h. Control seedlings were transferred to non-supplemented MS medium. For incubation in the dark, the plates were covered with several layers of aluminum foil. *Nicotiana benthamiana* plants used for transient expression experiments were grown on soil in the greenhouse at 18–28°C under LD conditions.

Transient expression assays

Cultures of *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 cells transformed with constructs to produce DXS-GFP, DXR-GFP, or G11-GFP [31,33] were used for agroinfiltration of leaves from 4 to 6 week-old *N. benthamiana* plants using the syringe method [35]. To prevent silencing, leaves were co-infiltrated with an *Agrobacterium* strain transformed with a vector expressing the HC-Pro silencing suppressor [35]. A 1:1 mixture of the two cultures was agroinjected in the abaxial part of several leaves. Then, plants were left in the greenhouse and leaf samples were collected at different timepoints after injection (from day 1 to day 7) for further analyses.

Analysis of transcript levels

RNA for quantitative PCR analysis was obtained from 30-day-old plants. The full rosette was harvested by grinding in liquid nitrogen, and RNA was obtained using the Qiagen RNeasy Plant kit from approximately 100 mg tissue (fresh weight). One μg total RNA was used in 20 μL reverse transcriptase reactions (Roche) using manufacturer's instructions and a poly dT₁₈V anchored primer at 48°C. cDNA synthesis reactions were halted after one hour by heating at 70°C and then diluted 1:10 (v/v) with pure water. One μL was used as template in a PCR that also included 10 μL 2X SYBR Green mix (Roche), 0.6 μL each forward and reverse primers (10 μM), and pure water for a final volume of 20 μL . Primers DXR-F (5'- A G T A G C G G A T G C G T T G A A G C) and DXR-R (5'- G C G G A T G A A T G A C A A T C T C T A T A T C G) were used in these experiments. cDNA loading in individual reactions was normalized to the levels of *APT1* and *RP21s* genes, whose sequence and stability under these conditions were previously reported [36]. Six individual plants were used for each transgenic or wild type line and each biological replicate was analyzed in three technical replicates for each gene of interest or normalizer. Relative fold calculations were performed using the efficiency corrected model [37].

Chloroplast isolation and membrane fractionation

Chloroplasts were isolated from 10 day-old seedlings as described [28] and further fractionation was performed as indicated [38,39]. Briefly, chloroplasts were hypertonicity lysed in 0.6 M sucrose supplemented with 0.5% (w/v) protease inhibitor cocktail (Sigma). Stromal fraction was collected after centrifugation at 100,000 xg. The membrane pellet was resuspended in the same buffer and centrifuged again to prevent stromal contamination. A Potter-Elvehjem homogenizer was used to resuspend the chloroplast membranes in 1 mL TED buffer (50 mM Tricine pH 7.5, 2 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol). Subsequent separation was performed in sucrose density gradients as described [38,39] but using a half of the volumes. Native protein

extracts from whole seedlings were used for the separation of soluble and insoluble (with protein aggregates) fractions as described [30].

Immunoblot analysis of protein levels

Protein extracts from chloroplast fractions or whole plants were obtained as described above and elsewhere [31] and directly used for immunoblot analysis or proteinase K accessibility assays as described [30]. Antibodies raised against DXS and DXR [31], GFP (Invitrogen), plastome-encoded ClpP1 [28], and chloroplast-imported proteins AtpB, ClpB3, PsbA, and Tic40 (Agrisera) were used diluted 1:500 for DXS and Tic40, 1:1,000 for ClpP1, 1:2,000 for GFP, AtpB and PsbA, 1:3,000 for ClpB3, and 1:6,000 for DXR. Chemiluminescent signals were visualized using a LAS-4000 image analyzer (Fujifilm) and quantified with Quantity One (Bio-Rad).

Confocal imaging

Subcellular localization of GFP fusion proteins was observed by direct examination of plant tissue with a Leica TCS 4D Confocal Laser Scanning Microscope. GFP fluorescence was detected using a BP515-525 filter after excitation with blue light at 488 nm. Chlorophyll autofluorescence was detected using a LP590 filter after excitation with green light at 568 nm. Stacks of acquired images were processed with Imaris 6.1.5 (Bitplane) to achieve three dimensional images.

Transmission electron microscopy (TEM) immunogold labelling

Transgenic 35S:DXR-GFP seedlings were germinated and grown on MS plates for 3 days under LD conditions. Then, cotyledon samples were collected and immediately fixed as described [40]. Briefly, freshly cut cotyledons were dissected in fresh fixative solution (1.25% (v/v) glutaraldehyde and 2% (v/v) formaldehyde in sodium 0.05 M phosphate buffer pH 7.5), and placed under gentle vacuum for 5 cycles of 2 min each. Then, samples were kept in fixative solution for 2h at room temperature. After 3 washes of 10 min with 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.5, dehydration was carried out in a series of 10 min washes with 30%, 50%, 70%, 80%, 95% and 100% ethanol. For infiltration, a mixture of LR White acrylic resin (Sigma) and 100% ethanol at proportions 1:2, 1:1, 3:1, and 1:0 (1h each) was used. Following several resin changes for 3 days at 4°C, sample embedding was performed by polymerization for 24 h at 50°C in 0.3 ml gelatin capsules.

Ultrathin (100 nm) sectioning and immunogold labelling was carried out as described [41] using anti-DXR or pre-immune sera. Silver enhancement was carried out for 3–5 min at 20°C with intenSE (Amersham-Pharmacia Biotech) following manufacturer's instructions. Post-staining employed 2% uranyl acetate aqueous solution for 2 min followed by 2 quick rinses in distilled water. Observations were made at 80 kV using a Jeol 1200 EX transmission electron microscope equipped with a Gatan Bioscan camera to capture digital pictures.

Results

Arabidopsis DXS and DXR are stromal proteins that can also be found in insoluble and membrane fractions

The first two enzymes of the MEP pathway, DXS and DXR, have been proposed to contain bipartite sorting sequences for subplastidial targeting to the thylakoid membrane or lumen [15,16]. However, no experimental evidence is currently available to support this claim, as proteomic studies identified both enzymes in the stroma [14]. As a first step to test the

computational analysis predictions, we investigated whether the endogenous Arabidopsis enzymes were associated to thylakoids or associated structures such as plastoglobules by separating them using flotation centrifugation with sucrose density gradients [32] and then analyzing the presence of DXS and DXR in the fractions by immunoblot analysis (Fig 1A). Chloroplasts were isolated from transgenic plants producing the plastoglobule marker PGL34-YFP [32] and used for membrane fractionation, protein extraction, and immunoblot analysis with antibodies against DXS and DXR as described [30,31,38]. The same fractions were also analyzed for the presence of control proteins known to be localized in plastoglobules (PGL34-YFP), embedded in the thylakoid membrane (PsbA), associated to the stromal side of the thylakoid membrane (AtpB), or found in the stroma (ClpP1). Both DXS and DXR were found in the soluble (stromal) fraction, as expected. However, DXS and, to a lower extent, DXR proteins were also detected in fractions corresponding to membrane-containing structures other than plastoglobules (Fig 1A).

A recent work showed that DXS is prone to aggregation [30]. DXS aggregates become insoluble and associate to chloroplast membrane fractions until they are either solubilized by specific disaggregating chaperones or eventually degraded by the stromal Clp protease complex [30]. In wild type Arabidopsis plants growing under normal conditions, the proportion of soluble to insoluble (i.e. membrane-associated) DXS protein is close to 2:1 (Fig 1B). When Clp-mediated degradation of DXS is compromised, total DXS protein levels increase but the proportion of soluble to insoluble protein remains virtually unchanged because disaggregating chaperones such as ClpB3 also accumulate to relief protein folding stress (Fig 1B) [28–30,42,43]. Thus, Clp-defective mutants such as *clp1* show increased levels of both ClpB3 and DXS proteins but no changes in the soluble to insoluble ratio (Fig 1B). DXR levels are also upregulated in *clp1* plants, suggesting that this protein might also be a Clp protease client [28]. But unlike DXS, DXR is not prone to aggregation [30] and it remains mostly soluble in wild type plants and *clp1* mutants, showing a proportion of around 25:1 of soluble to insoluble protein (Fig 1B). Most interestingly, the rate of degradation of DXR by the Clp protease appears to be similar to that for DXS [28] whereas a 20-fold longer incubation with proteinase K was required to degrade DXR at the same rate than DXS in wild type plant extracts (Fig 1C). Together, the results suggest that the association of DXS to chloroplast membrane fractions might be an unspecific effect resulting from the formation of insoluble protein aggregates (particularly after stress episodes). In the case of DXR, most protein is found soluble in stromal fractions (i.e. non-aggregated) but poorly accessible to unspecific proteolytic degradation (as deduced from proteinase K protection assays).

Analysis of GFP-fusion proteins confirms a differential distribution of DXS and DXR within chloroplasts

To further investigate the different subplastidial distribution of DXS and DXR, we analyzed the localization of full-length versions of the proteins fused to GFP at different time points after agroinfiltration of *Nicotiana benthamiana* leaves with the corresponding 35S:DXS-GFP and 35S:DXR-GFP constructs [31]. As a stromal protein control we used the isoprenoid enzyme geranylgeranyl diphosphate synthase 11 (GGPPS11 or G11), previously found to be exclusively located in the stroma by both proteomic approaches and confocal microscopy analysis of G11-GFP fluorescence [14,44]. As expected, chloroplasts of *N. benthamiana* leaves agroinfiltrated with the 35S:G11-GFP construct [33] showed a fairly homogeneous distribution of fluorescence within the chloroplast at all time points analyzed, from day 1 (d1) to day 7 (d7) after agroinfiltration (Fig 2). G11-GFP fluorescence was also detected in stromules (Fig 2), consistent with its reported localization in the stroma.

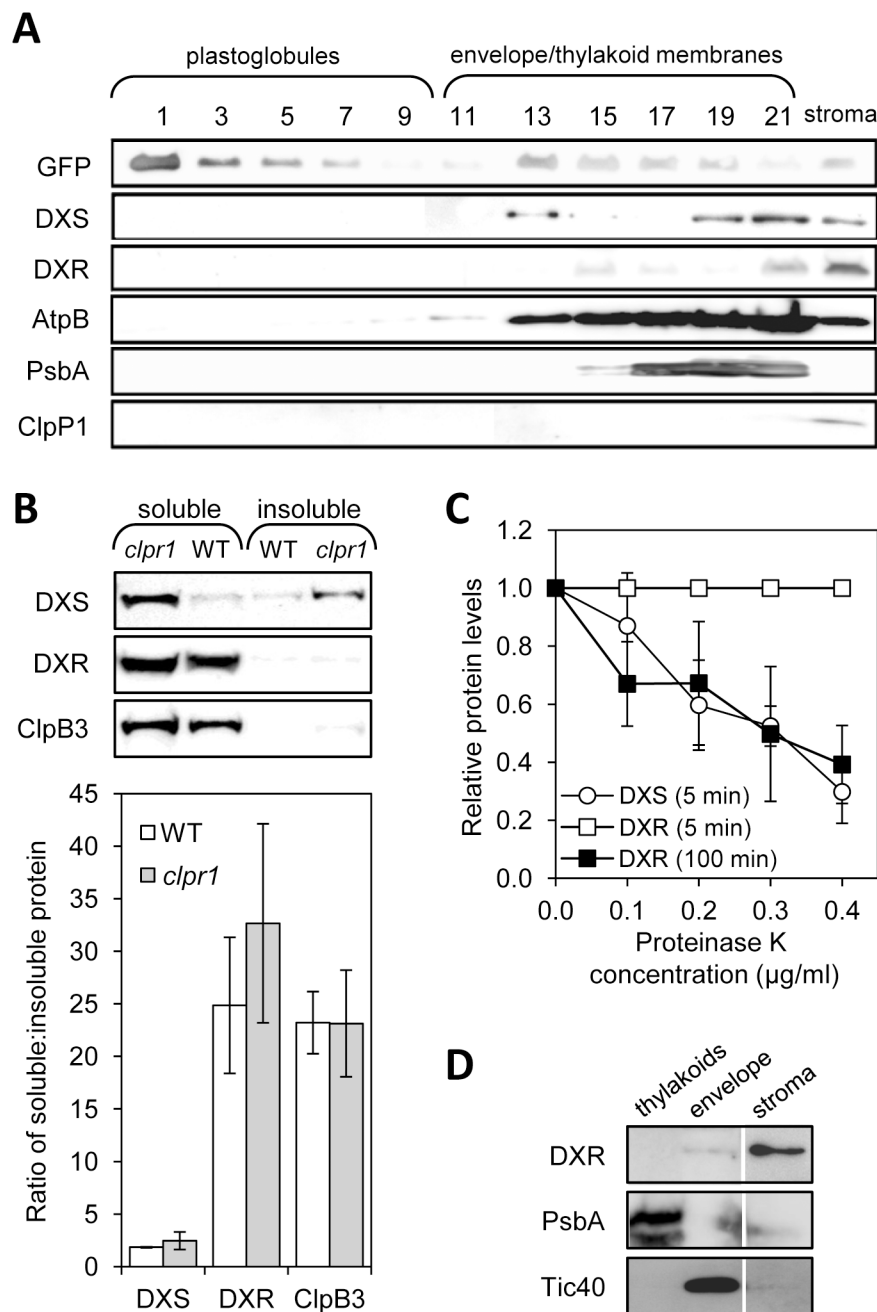


Fig 1. Immunoblot analysis of chloroplast subfractions and protein stability. (A) Chloroplasts isolated from transgenic plants overexpressing PGL34-YFP were used to separate soluble (stromal) and membrane fractions. The latter were loaded in a sucrose density gradient and separated by ultracentrifugation. Proteins contained in 35 μl of sequential fractions collected from the top of the gradient or from the stromal sample were separated by SDS-PAGE and transferred to a membrane for immunoblot analysis with antibodies against GFP (to detect PGL34-YFP) or the indicated endogenous proteins. (B) Immunoblot analysis of the distribution of DXS and DXR proteins in soluble and insoluble fractions isolated from native protein extracts of wild type and *clpr1* mutant seedlings. The graph represents mean $\pm$ SEM of the ratios of soluble vs. insoluble protein levels in $n = 3$ independent experiments. (C) Quantification of DXS and DXR protein levels after immunoblot analysis of wild type protein extracts incubated with the indicated concentrations of proteinase K for the indicated times. Mean $\pm$ SEM of $n = 4$ independent experiments are shown. (D) Immunoblot analysis of the distribution of DXS in envelope and thylakoid membranes isolated from wild type chloroplasts. A lane corresponding to the stromal fraction is also shown. The same extracts were incubated with antibodies against marker proteins of the envelope (Tic40) and the thylakoid membranes (PsbA). Representative blots are shown in all cases.

doi:10.1371/journal.pone.0150539.g001

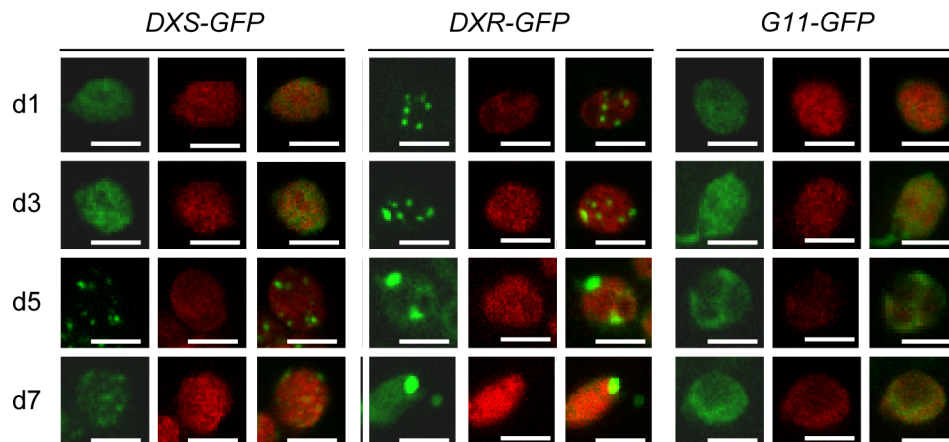


Fig 2. Distribution of GFP-tagged isoprenoid enzymes in chloroplasts of agroinfiltrated *N. benthamiana* leaves. Images show representative mesophyll chloroplasts from leaves collected at different days (from 1 to 7) after agroinfiltration with the indicated constructs. For each construct, GFP fluorescence (left columns), chlorophyll autofluorescence (middle columns) and merged images (right columns) are shown. Bars, 5 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0150539.g002

Stromal fluorescence was also detected for DXS-GFP and DXR-GFP at all timepoints analyzed. However, these two fusion proteins were also found to form fluorescent corpuscles (Fig 2). In the case of DXS-GFP, fluorescence was predominantly localized in the stroma at early timepoints after agroinfiltration. Later on (d5), it showed a spotted distribution like that reported for the DXS-GFP fusion protein in stably transformed *Arabidopsis* plants (Fig 2) [30,31]. By d7, fluorescent spots were fainter and a more general distribution of the DXS-GFP protein in chloroplasts was observed (Fig 2). This is consistent with our current understanding that DXS-GFP protein overaccumulation could lead to the formation of protein aggregates (fluorescence spots). Subsequent up-regulation of disaggregating chaperones such as ClpB3 would eventually contribute to remove the DXS-GFP clumps, resulting in a more dispersed fluorescence [30]. A distribution in intraplastidial speckles was also observed for DXR-GFP, but in this case small fluorescent spots were already detected during the first stages (d1-d3) following agroinfiltration (Fig 2). Then, DXR-GFP fluorescence concentrated in a few large bodies in the chloroplast (Fig 2). Some fluorescent bodies lacking chlorophyll were also detected outside the chloroplast, particularly at late timepoints (d7). The following experiments were designed to study the nature of these bodies.

DXR-GFP accumulates in large fluorescent bodies that can eventually leave the chloroplast

To further investigate the nature of DXR-GFP bodies, the 35S:DXR-GFP construct was used to stably transform *Arabidopsis* plants of the Columbia accession (Fig 3). Transgenic lines with different levels of transgene expression were obtained, ranging from 2-fold to 30-fold higher levels of DXR-encoding transcripts compared to untransformed controls (Fig 3A). Representative lines with low (L), medium (M) or high (H) levels of transgene expression were next selected for immunoblot analysis of DXR-GFP protein levels using a GFP-specific antibody. As shown in Fig 3B, a good correlation between transcript and protein levels was found. To evaluate whether the recombinant protein accumulated in transgenic lines was enzymatically active, we used an indirect assay to estimate DXR activity *in vivo* based on quantifying plant resistance to fosmidomycin (FSM), a competitive inhibitor of DXR activity [34,45,46]. Blockage of DXR

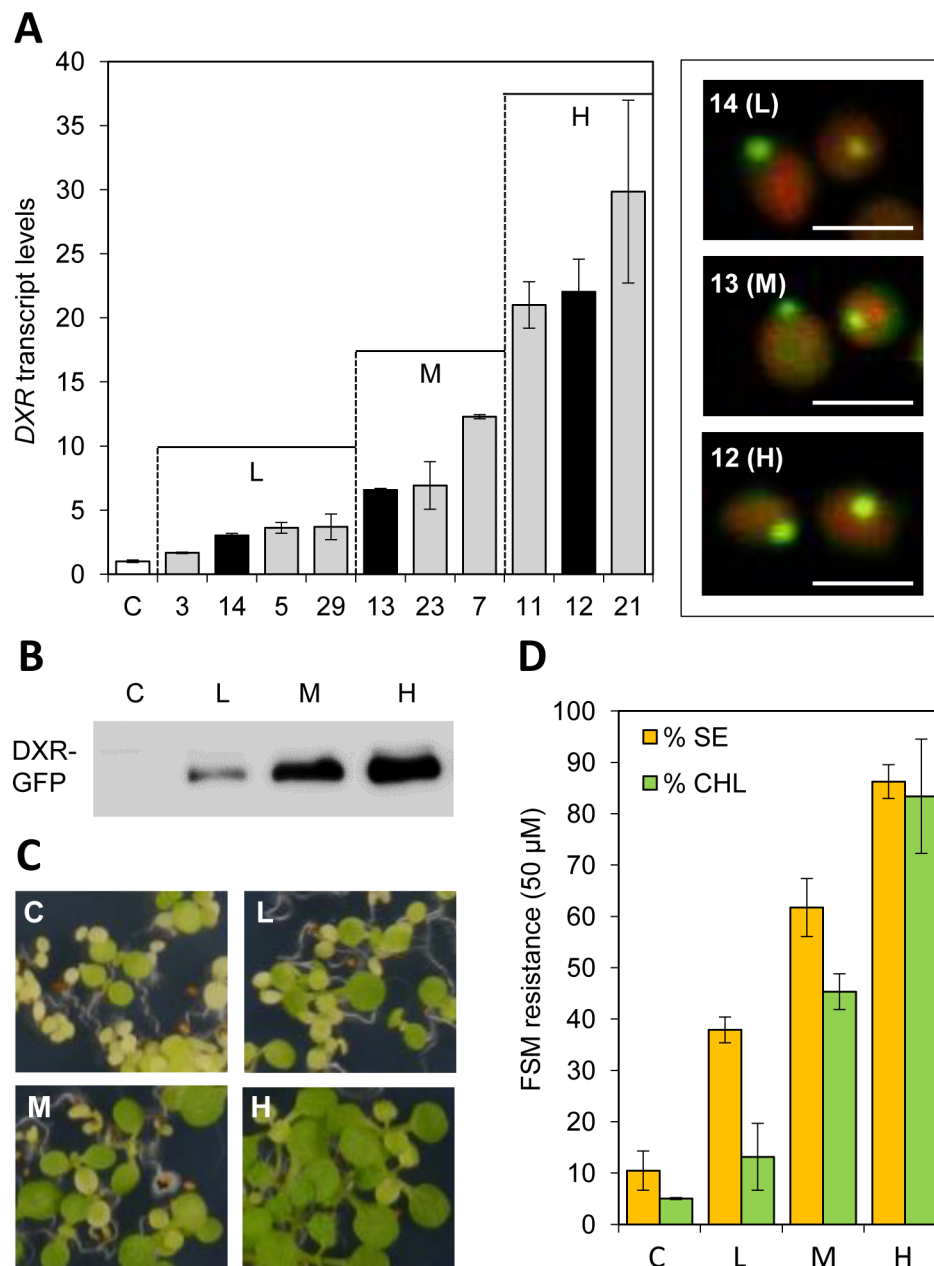


Fig 3. Characterization of transgenic *Arabidopsis* lines producing DXR-GFP. (A) Relative levels of *DXR* transcripts in 30-day-old soil-grown wild type plants (C, white column) and *35S:DXR-GFP* lines (grey and black columns) ($n = 6$ per group). The box on the right shows images of merged chlorophyll and GFP fluorescence signals in chloroplasts from the guard cells of lines representative of low (L), medium (M) and high (H) transgene expression levels (black columns). (B) Immunoblot analysis of DXR-GFP levels with an anti-GFP antibody in protein extracts (10 μ g) from 10-day-old seedlings of the indicated lines. (C) Representative pictures of seedlings of the indicated lines germinated and grown for 10 days in the presence of fosmidomycin (50 μ M). (D) Quantification of the phenotype observed in (C) as the percentage of seedling establishment (SE) and chlorophyll content (CHL) in the presence of fosmidomycin relative to those in the absence of inhibitor.

doi:10.1371/journal.pone.0150539.g003

activity with FSM causes a concentration-dependent inhibition of seedling establishment (SE, defined as the production of true leaves that can support further plant development) and

chlorophyll accumulation [19,47]. Both parameters can be used as a quantitative measure of FSM resistance [34]. After germination and growth in the presence of 50 μ M FSM, only a low proportion of untransformed control plants were able to produce some chlorophyll and develop rudimentary true leaves (Fig 3C). This proportion significantly ($p < 0.05$) increased in transgenic lines (Fig 3C), showing a strong correlation between DXR-GFP levels (Fig 3B) and FSM resistance estimated as SE rates and chlorophyll content in the presence of inhibitor (Fig 3D). We therefore concluded that at least a fraction of the DXR-GFP protein produced in the transgenic lines is enzymatically active. This is consistent with our previous conclusion that DXR mostly accumulates in a non-aggregated form (Fig 1).

Despite the clear differences between the levels of recombinant DXR-GFP protein accumulating in the selected Arabidopsis L, M, and H lines, all of them showed a punctate pattern of GFP fluorescence (Fig 3A) similar to that observed in *N. benthamiana* leaves transiently expressing the same reporter (Fig 2). Chlorophyll-lacking fluorescent spots were also observed in the periphery of chloroplasts in all lines (Fig 3A). To test whether this distribution could be an artifact caused by the unspecific overaccumulation of any plastid-targeted GFP fusion protein, Arabidopsis plants were transformed with the 35S:*G11-GFP* construct and the levels of G11-GFP protein were analyzed in the resulting transgenic lines [33]. The maximum accumulation of G11-GFP obtained by this strategy was similar to that of DXR-GFP in L lines, as estimated by immunoblot analysis with a GFP-specific antibody (Fig 4A). Comparison of lines showing similar levels of these two recombinant proteins confirmed that G11-GFP fluorescence was uniformly distributed in the stroma of stomata and mesophyll chloroplasts whereas DXR-GFP fluorescence accumulated in large speckles both inside and outside chloroplasts (Fig 4B). While overproduction of a GFP-tagged protein can certainly alter the stoichiometry of the protein complement in the chloroplast and eventually cause artifacts, the observation that only the accumulation of DXR-GFP proteins (but not of very similar levels of G11-GFP) triggers the formation of large corpuscles indicates that this is a specific effect of the DXR protein.

Fluorescent bodies containing DXR-GFP were found inside the chloroplast (what we refer to as phase #1) in the periphery of the organelle (#2), protruding from the chloroplast (#3), or completely separated from it (#4) (Fig 5). All four different phases could be observed even within the same cell (Fig 5A). Serial confocal sectioning showed that DXR-GFP bodies were elongated and confirmed that they were virtually devoid of chlorophyll autofluorescence (Fig 5B and 5C), suggesting that they might be formed by stromal content. Immunolabeling of DXR-GFP in 35S:*DXR-GFP* (H) plants using polyclonal anti-DXR antibodies followed by transmission electron microscopy (TEM) identified the same phases in mesophyll cells (Fig 6). While no labeling was found in transgenic samples incubated with preimmune serum, TEM observations of 35S:*DXR-GFP* (H) sections incubated with anti-DXR detected labeling of actual vesicles containing the recombinant protein. Consistent with the confocal microscopy data (Fig 5), these vesicles had an estimated size of around 0.5–1 μ m in diameter and displayed an electron density similar to that of the stroma (Fig 6). Also in agreement with confocal microscopy data, most of the vesicles in TEM sections were observed inside chloroplasts (i.e. in phase #1), some were found in phases #2 and #3, and only a few were located free in the cytoplasm (#4). We therefore concluded that these phases could correspond to sequential stages in a pathway to expel DXR-GFP from chloroplasts, i.e. they would be formed by engulfing stromal DXR-GFP enzymes and then they would be transported to the plastid envelope and released from chloroplasts.

DXR immunolocalization experiments in untransformed (wild type) controls detected only occasional labeling and no distinctive vesicles in chloroplasts (Fig 6). However, separation of envelope and thylakoid membranes isolated from wild type chloroplasts followed by immunoblot analysis of DXR and marker proteins (Tic40 for the envelope and PsbA for thylakoids) showed that a fraction of the endogenous DXR enzyme was associated with envelope membranes (Fig 1D).

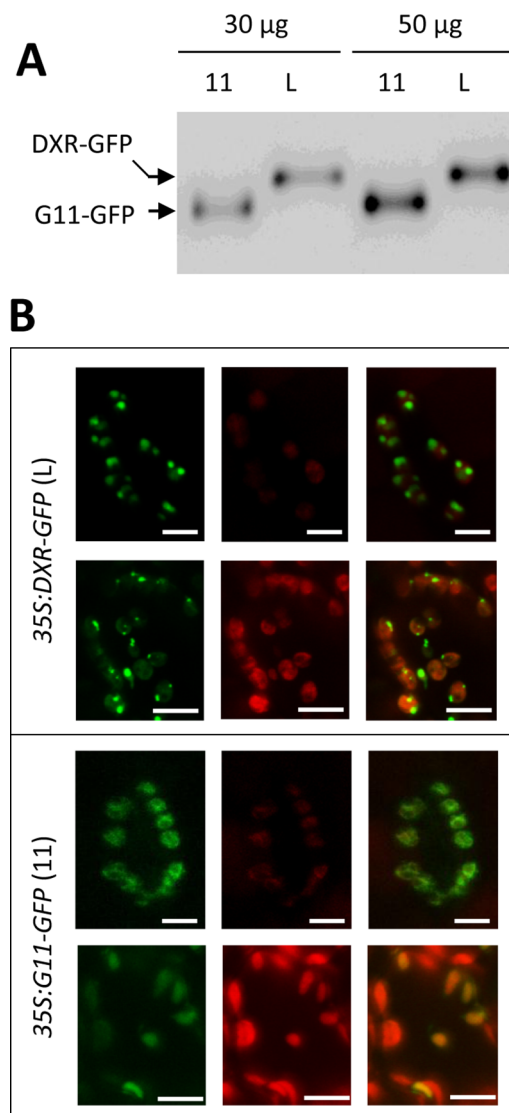


Fig 4. Differential distribution of DXR-GFP and GGPPS11-GFP proteins in chloroplasts of transgenic Arabidopsis plants. (A) Immunoblot analysis of protein extracts from 35S:DXR-GFP (L line) and 35S:G11-GFP (11) plants with an anti-GFP antibody. Results with two different protein extract amounts are shown to illustrate that these lines have very similar levels of the corresponding GFP-tagged protein. (B) Representative images of stomata (upper rows) and mesophyll cells (lower rows) from leaves of the plants analyzed in (A). Images show GFP fluorescence (left columns), chlorophyll autofluorescence (central columns), or both (right columns). Bars, 5 µm (stomata) and 10 µm (mesophyll).

doi:10.1371/journal.pone.0150539.g004

These results, together with the observed resistance of DXR in protease protection assays despite its solubility (Fig 1C), suggest that some of the endogenous DXR enzyme might indeed be found inside vesicles formed by stromal material engulfed by envelope membranes.

Excess DXR might be removed from chloroplasts by a process likely independent of autophagy

The features of DXR-GFP vesicles were reminiscent of previously identified Rubisco-containing bodies (RCBs) and starch granule-like structures (SGLSs), which are released from the

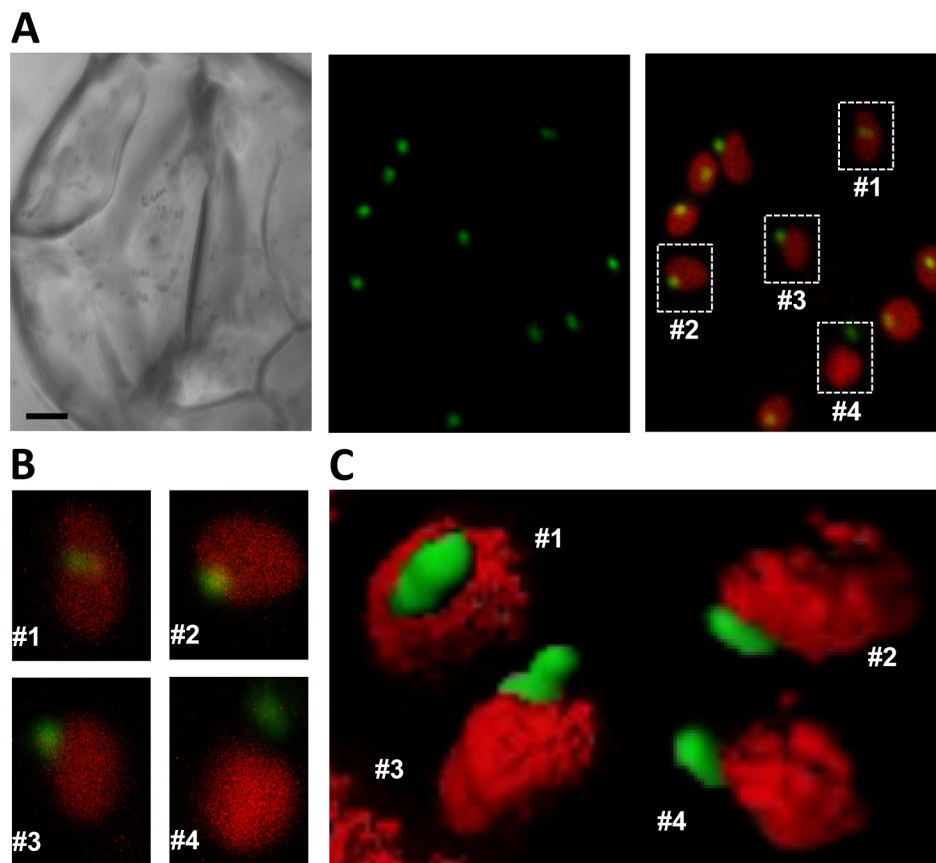


Fig 5. Differential localization of DXR-GFP bodies inside and outside chloroplasts. (A) Guard cells of a 35S:DXR-GFP (H line) plant. The pictures show a bright field image (left panel), GFP fluorescence (central panel), and merged GFP and chlorophyll fluorescence (right panel). Bar, 2 μ m. (B) Magnification of the chloroplasts boxed in (A). (C) Reconstructed 3D images of representative chloroplasts at the indicated phases of DXR-GFP vesicle development.

doi:10.1371/journal.pone.0150539.g005

chloroplast and delivered to the vacuole for degradation by autophagy [48–50]. To investigate whether the vesicles containing DXR-GFP could be of autophagic nature we used concanamycin A, an inhibitor that promotes an accumulation of autophagic bodies inside the vacuole [48,51]. Transgenic 35S:DXR-GFP (H) lines were germinated and grown for 4 days under LD conditions (16h light and 8h dark) on solid MS medium and then individual seedlings were transferred to fresh medium either supplemented or not with 10 μ M concanamycin A. Plates were incubated for 24h in the dark before analyzing the presence of DXR-GFP fluorescence by confocal fluorescence microscopy. As shown in Fig 7, concanamycin A-treated plants did not show more fluorescent vesicles in vacuoles but instead a more diffused distribution of DXR-GFP inside chloroplasts. A similar effect had been previously reported for CV (for Chloroplast Vesiculation) containing vesicles (CCVs), which are normally expelled from chloroplasts by an autophagy-independent process [52]. We therefore conclude that a pathway independent of autophagy might be responsible for the eventual degradation of DXR-GFP bodies once released from the chloroplast.

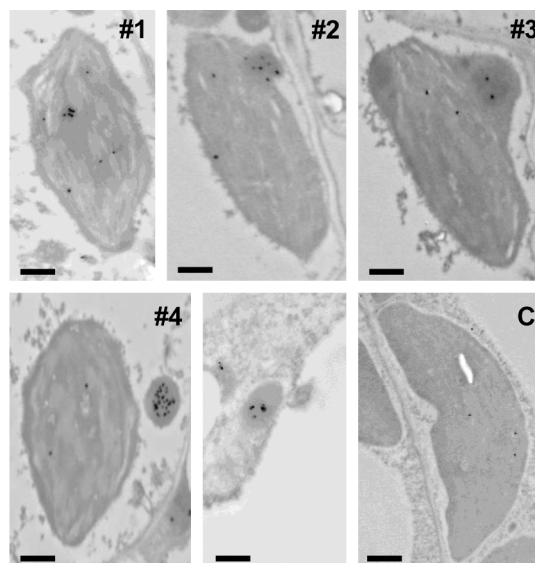


Fig 6. Immunolocalization of DXR-GFP in vesicles. Cross-sections of cotyledons from transgenic plants expressing DXR-GFP (H line) and untransformed wild type controls (C) were used for immunogold labelling with anti-DXR serum and observed at the transmission electron microscopy (TEM) level. Numbers indicate phases of DXR-GFP vesicle development in the transgenic lines (the unnumbered panel shows an isolated vesicle). ar, 0.5 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0150539.g006

Discussion

While all MEP pathway enzymes have been identified in the stroma by proteomic studies [14], *in silico* predictions [15,16] and the experimental data reported here show that DXS and DXR can also associate with membrane structures in the chloroplast. Furthermore, a differential distribution of DXS and DXR in non-stromal, particulate fractions was observed by immunoblot analysis of the endogenous enzymes in chloroplast membrane (i.e. insoluble) subfractions

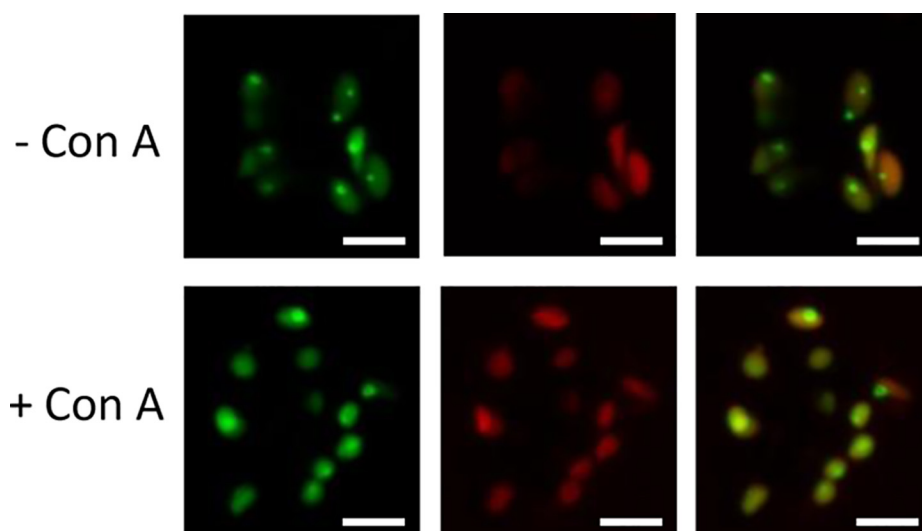


Fig 7. Effect of concanamycin A on DXR-GFP localization. Pictures show representative images of GFP fluorescence (left columns), chlorophyll autofluorescence (central columns), or both (right columns) in guard cells of *35S:DXR-GFP* (H line) plants either exposed (+) or not (-) to 10 μ M concanamycin A for 24 h. Bars = 5 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0150539.g007

(Fig 1) and by fluorescence detection of GFP-tagged versions either transiently (Fig 2) or stably (Fig 3) [31] expressed. The localization of the same protein in different chloroplast subcompartments appears to be quite common [14,53]. This might be achieved by the use of different sorting signals in the protein sequence or by interaction with other protein partners that are delivered to different plastidial locations. While stroma-localized DXS and DXR could fulfill the expected role of these enzymes in the first two consecutive steps of the MEP pathway, a proportion of both proteins might be delivered to other subplastidial locations using distinct mechanisms. Based on the results shown here, we conclude that the prediction that DXS and DXR might be targeted to thylakoids upon import into chloroplasts [15,16] is unlikely. Instead, the different propensity of these two MEP pathway enzymes to aggregate and become insoluble might explain their distinct pattern of subplastidial distribution and membrane association.

Most DXS is found soluble in the stroma, but this enzyme is prone to become misfolded (i.e. inactive) and to aggregate even under normal growth conditions (Fig 1) [30]. It is therefore possible that the DXS proteins detected here in insoluble chloroplast fractions correspond to aggregates of inactive protein that unspecifically bind to chloroplast membranes. These aggregates, observed as fluorescent speckles in cells expressing the DXS-GFP reporter protein (Fig 2) [31], can be eventually solubilized and the protein degraded by the Clp protease complex [30]. While DXR might also be a target for the Clp protease [28], the mechanism for excess protein removal appears to be different. Unlike DXS, DXR appears to be a very stable protein. Is more resistant than DXS to degradation by unspecific proteases (Fig 1C) or by endogenous (likely Clp) proteases after a heat shock [31], and it remains in the soluble (stromal) fraction even under stress conditions that promote general protein aggregation (Fig 1) [30]. We observed here that an extra production of recombinant DXR-GFP protein appears to result in their storage in large elongated bodies or vesicles. Even though we have only observed these vesicles in transgenic lines expressing a GFP-tagged DXR enzyme under a strong constitutive promoter (35S), the fact that they are not formed in plants overexpressing the G11-GFP protein at similar levels (or in many other transgenic lines producing GFP fusion proteins in chloroplasts; <http://podb.nibb.ac.jp/Organellome/>) suggests that they are not an artifact. The observation that the vesicles are formed even when levels of DXR-GFP protein are low (i.e. in transgenic L lines and soon after transient expression of the reporter protein in *N. benthamiana* cells), the reduced accessibility of the endogenous DXR enzymes to external proteolytic degradation, and the co-localization of part of these enzymes with envelope membrane fractions (Figs 1, 2 and 3) further suggest that the vesicles could be formed by engulfing stromal fractions containing soluble (i.e. active) DXR proteins when the endogenous enzymes accumulate above a certain threshold. Eventually, the vesicles could be expelled from the chloroplast, perhaps to deliver their stromal content (including DXR-GFP) to degradation by a process likely independent of autophagy.

The role of autophagy in the removal of chloroplast proteins (e.g. via RCBs) and metabolites (e.g. via SSGLs) has been well established [48–50,54]. It was proposed that RCBs and SSGLs (i.e. vesicles containing stromal material) might be formed by sequestering chloroplast protrusions or stromules from the main body of the organelle by an isolation membrane [48,49]. Once released into the cytoplasm, these vesicles would be engulfed by autophagosomes and transported to the vacuole for degradation. In the case of DXR-GFP vesicles, our results suggest that they are formed inside the chloroplast by trapping stromal contents (phase #1) and then transported to the envelope (phase #2). Following an evagination process (phase #3), a vesicle likely surrounded by envelope membranes would be released from the chloroplast (phase #4). The destination of exported vesicles within the cell remains unknown. However, some of them were found in the vicinity of the vacuole (Fig 6), suggesting that they might eventually release their content into these organelles for degradation. Besides autophagy, other vesicle-mediated pathways have been described for the degradation of chloroplast stroma proteins, including

those involving senescence-associated vacuoles (SAVs) [55] and CCVs [52]. In the case of CCVs, treatment with concanamycin A inhibited the release of CCVs from chloroplasts, similar to what we observed for DXR-GFP (Fig 7). However, further experiments would be necessary to ascertain the specific nature of the DXR-GFP vesicles.

Our work confirms that chloroplast protein homeostasis is a complex phenomenon achieved by multiple mechanisms. The functioning of chloroplasts is intimately integrated into the metabolism of plant cells but these endosymbiotic organelles still remain semi-autonomous functional entities that are able to regulate their own biochemistry by relatively independent mechanisms. An important part of this regulation relies on the effective control of plastidial enzyme activities. In the chloroplast, complex networks of plastidial chaperones ensure proper folding, assembly, and suborganellar targeting of imported proteins. Chaperones and proteases are also essential components of the protein quality control system that allows the stabilization, refolding, or degradation of mature proteins that lose their native conformation and activity after metabolic perturbations or environmental challenges [4–6]. We previously found that inactive (e.g. misfolded) forms of DXS are recognized by the Arabidopsis J-protein J20 and hence delivered to Hsp70 and Hsp100 chaperones for either proper folding or degradation by the Clp protease [30,31]. Here we show that an excess of DXR activity might trigger a completely different degradation pathway that involves the packaging of the enzyme in vesicles and its eventual removal, likely by an autophagy-independent process. Interestingly, gradual depletion of a catalytic subunit of the stromal Clp protease in the alga *Chlamydomonas reinhardtii* induces the formation of vesicles and a cytoplasmic vacuolization reminiscent of autophagy [56], suggesting a connection between intra- and extraplastidial mechanisms for stromal protein degradation. Together, our results suggest that distinct but likely coordinated mechanisms act to control DXS and DXR homeostasis in order to tightly regulate the metabolic flux of the MEP pathway. We propose that the localization of these enzymes in non-stromal fractions does not respond to a specific physiological role beyond the control of enzyme activity levels via aggregation/disaggregation and protein-specific degradation mechanisms. Understanding the molecular nature of these mechanisms during the normal plant life cycle will contribute to make more informed decisions in future biotechnological approaches aimed to manipulate the levels of plastidial isoprenoids of interest in crop plants.

Acknowledgments

We thank Felix Kessler for the gift of the *pCAMBIA3300-PGL34-YFP* line. CP and MOA received predoctoral fellowships from Spanish CSIC (JAE-PRE program) and MINECO (FPI program), respectively. EL is supported by a Mexican CONACYT predoctoral fellowship.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CP EL VB PP MRC. Performed the experiments: CP EL MOA MAP. Analyzed the data: CP EL VB MOA MAP PP MRC. Contributed reagents/materials/analysis tools: VB MAP. Wrote the paper: CP EL PP MRC.

References

1. Nakai M (2015) The TIC complex uncovered: The alternative view on the molecular mechanism of protein translocation across the inner envelope membrane of chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1847: 957–967. doi: [10.1016/j.bbabi.2015.02.011](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.02.011) PMID: [25689609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25689609/)
2. Cline K, Dabney-Smith C (2008) Plastid protein import and sorting: different paths to the same compartments. *Curr Opin Plant Biol* 11: 585–592. doi: [10.1016/j.pbi.2008.10.008](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.10.008) PMID: [18990609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18990609/)
3. Li HM, Chiu CC (2010) Protein transport into chloroplasts. *Annu Rev Plant Biol* 61: 157–180. doi: [10.1146/annurev-arplant-042809-112222](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112222) PMID: [20192748](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20192748/)

4. Trosch R, Muhlhaus T, Schroda M, Willmund F (2015) ATP-dependent molecular chaperones in plastids—More complex than expected. *Biochim Biophys Acta* 1847: 872–888. doi: [10.1016/j.bbabi.2015.01.002](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.01.002) PMID: [25596449](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25596449/)
5. Sakamoto W (2006) Protein degradation machineries in plastids. *Annu Rev Plant Biol* 57: 599–621. PMID: [16669775](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16669775/)
6. Jarvis P, Lopez-Juez E (2013) Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 787–802. doi: [10.1038/nrm3702](https://doi.org/10.1038/nrm3702) PMID: [24263360](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24263360/)
7. Croteau R, Kutchan T, Lewis N (2000) Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan B, Gruissem W, Jones R, editors. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists. pp. 1250–1268.
8. Pulido P, Perello C, Rodriguez-Concepcion M (2012) New insights into plant isoprenoid metabolism. *Mol Plant* 5: 964–967. doi: [10.1093/mp/sss088](https://doi.org/10.1093/mp/sss088) PMID: [22972017](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22972017/)
9. Hemmerlin A, Harwood JL, Bach TJ (2012) A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? *Prog Lipid Res* 51: 95–148. doi: [10.1016/j.plipres.2011.12.001](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.001) PMID: [22197147](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22197147/)
10. Rodríguez-Concepción M, Boronat A (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* 130: 1079–1089. PMID: [12427975](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12427975/)
11. Phillips MA, Leon P, Boronat A, Rodríguez-Concepcion M (2008) The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends Plant Sci* 13: 619–623. doi: [10.1016/j.tplants.2008.09.003](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.09.003) PMID: [18948055](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18948055/)
12. Zhao L, Chang WC, Xiao Y, Liu HW, Liu P (2013) Methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 82: 497–530. doi: [10.1146/annurev-biochem-052010-100934](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052010-100934) PMID: [23746261](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23746261/)
13. Hsieh MH, Chang CY, Hsu SJ, Chen JJ (2008) Chloroplast localization of methylerythritol 4-phosphate pathway enzymes and regulation of mitochondrial genes in ispD and ispE albino mutants in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 66: 663–673. doi: [10.1007/s11033-008-9297-5](https://doi.org/10.1007/s11033-008-9297-5) PMID: [18236010](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18236010/)
14. Joyard J, Ferro M, Masselon C, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Garin J, et al. (2009) Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Mol Plant* 2: 1154–1180. doi: [10.1093/mp/ssp088](https://doi.org/10.1093/mp/ssp088) PMID: [19969518](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19969518/)
15. Krushkal J, Pistilli M, Ferrell KM, Souret FF, Weathers PJ (2003) Computational analysis of the evolution of the structure and function of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a key regulator of the mevalonate-independent pathway in plants. *Gene* 313: 127–138. PMID: [12957384](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12957384/)
16. Fung PK, Krushkal J, Weathers PJ (2010) Computational analysis of the evolution of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase, an important enzyme in plant terpene biosynthesis. *Chem Biodivers* 7: 1098–1110. doi: [10.1002/cbdv.200900313](https://doi.org/10.1002/cbdv.200900313) PMID: [20491066](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20491066/)
17. Estévez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S, León P (2001) 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J Biol Chem* 276: 22901–22909. PMID: [11264287](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11264287/)
18. Mahmoud SS, Croteau RB (2001) Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8915–8920. PMID: [11427737](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11427737/)
19. Carretero-Paulet L, Cairo A, Botella-Pavia P, Besumbes O, Campos N, Boronat A, et al. (2006) Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in Arabidopsis plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Mol Biol* 62: 683–695. PMID: [16941216](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16941216/)
20. Enfissi EMA, Fraser PD, Lois LM, Boronat A, Schuch W, Bramley PM (2005) Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotech J* 3: 17–27.
21. Muñoz-Bertomeu J, Arrillaga I, Ros R, Segura J (2006) Up-regulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender. *Plant Physiol* 142: 890–900. PMID: [16980564](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16980564/)
22. Yang J, Adhikari MN, Liu H, Xu H, He G, Zhan R, et al. (2012) Characterization and functional analysis of the genes encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, the two enzymes in the MEP pathway, from *Amomum villosum* Lour. *Mol Biol Rep* 39: 8287–8296. doi: [10.1007/s11033-012-1676-y](https://doi.org/10.1007/s11033-012-1676-y) PMID: [22707144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22707144/)
23. Banerjee A, Sharkey TD (2014) Methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway metabolic regulation. *Nat Prod Rep* 31: 1043–1055. doi: [10.1039/c3np70124g](https://doi.org/10.1039/c3np70124g) PMID: [24921065](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24921065/)
24. Rodríguez-Concepción M (2006) Early steps in isoprenoid biosynthesis: Multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochem Rev* 5: 1–15.

25. Wright LP, Rohwer JM, Ghirardo A, Hammerbacher A, Ortiz-Alcaide M, Raguschke B, et al. (2014) Deoxyxylulose 5-Phosphate Synthase Controls Flux through the Methylerythritol 4-Phosphate Pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol* 165: 1488–1504. PMID: [24987018](#)
26. Hemmerlin A (2013) Post-translational events and modifications regulating plant enzymes involved in isoprenoid precursor biosynthesis. *Plant Sci* 203–204: 41–54. doi: [10.1016/j.plantsci.2012.12.008](#) PMID: [23415327](#)
27. Vranova E, Coman D, Grussem W (2013) Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu Rev Plant Biol* 64: 665–700. doi: [10.1146/annurev-arplant-050312-120116](#) PMID: [23451776](#)
28. Flores-Pérez U, Sauret-Güeto S, Gas E, Jarvis P, Rodríguez-Concepción M (2008) A Mutant Impaired in the Production of Plastome-Encoded Proteins Uncovers a Mechanism for the Homeostasis of Isoprenoid Biosynthetic Enzymes in Arabidopsis Plastids. *Plant Cell* 20: 1303–1315. doi: [10.1105/tpc.108.058768](#) PMID: [18469163](#)
29. Zybilov B, Friso G, Kim J, Rudella A, Rodríguez VR, Asakura Y, et al. (2009) Large scale comparative proteomics of a chloroplast Clp protease mutant reveals folding stress, altered protein homeostasis, and feedback regulation of metabolism. *Mol Cell Proteomics* 8: 1789–1810. doi: [10.1074/mcp.M900104-MCP200](#) PMID: [19423572](#)
30. Pulido P, Llamas E, Llorente B, Ventura S, Wright LP, Rodríguez-Concepción M (2016) Specific Hsp100 Chaperones Determine the Fate of the First Enzyme of the Plastidial Isoprenoid Pathway for Either Refolding or Degradation by the Stromal Clp Protease in Arabidopsis. *PLoS Genet* 12: e1005824. doi: [10.1371/journal.pgen.1005824](#) PMID: [26815787](#)
31. Pulido P, Toledo-Ortiz G, Phillips MA, Wright LP, Rodríguez-Concepción M (2013) Arabidopsis J-protein J20 delivers the first enzyme of the plastidial isoprenoid pathway to protein quality control. *Plant Cell* 25: 4183–4194. doi: [10.1105/tpc.113.113001](#) PMID: [24104567](#)
32. Vidi PA, Kessler F, Brehelin C (2007) Plastoglobules: a new address for targeting recombinant proteins in the chloroplast. *BMC Biotechnol* 7: 4. PMID: [17214877](#)
33. Ruiz-Sola MA, Coman D, Beck G, Barja MV, Colinas M, Graf A, et al. (2016) Arabidopsis GERANYL-GERANYL DIPHOSPHATE SYNTHASE 11 is a hub isozyme required for the production of most photosynthesis-related isoprenoids. *New Phytol* 209: 252–264. doi: [10.1111/nph.13580](#) PMID: [26224411](#)
34. Perello C, Rodríguez-Concepción M, Pulido P (2014) Quantification of plant resistance to isoprenoid biosynthesis inhibitors. *Methods Mol Biol* 1153: 273–283. doi: [10.1007/978-1-4939-0606-2_20](#) PMID: [24777805](#)
35. Llop-Tous I, Ortiz M, Torrent M, Ludevid MD (2011) The expression of a xylanase targeted to ER-protein bodies provides a simple strategy to produce active insoluble enzyme polymers in tobacco plants. *PLoS One* 6: e19474. doi: [10.1371/journal.pone.0019474](#) PMID: [21559333](#)
36. Phillips MA, D'Auria JC, Luck K, Gershenzon J (2009) Evaluation of Candidate Reference Genes for Real-Time Quantitative PCR of Plant Samples Using Purified cDNA as Template. *Plant Mol Biol Report* 27: 407–416. PMID: [24489433](#)
37. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45. PMID: [11328886](#)
38. Vidi PA, Kanwischer M, Baginsky S, Austin JR, Csucs G, Dörmann P, et al. (2006) Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *J Biol Chem* 281: 11225–11234. PMID: [16414959](#)
39. Wang S, Yin L, Mano J, Tanaka K (2015) Isolation of Chloroplast Inner and Outer Envelope Membranes. *Bio-protocol* 5: e1405.
40. Burlat V, Kwon M, Davin LB, Lewis NG (2001) Dirigent proteins and dirigent sites in lignifying tissues. *Phytochemistry* 57: 883–897. PMID: [11423139](#)
41. Oudin A, Mahroug S, Courdavault V, Hervouet N, Zelwer C, Rodríguez-Concepción M, et al. (2007) Spatial distribution and hormonal regulation of gene products from methyl erythritol phosphate and monoterpene-secoiridoid pathways in *Catharanthus roseus*. *Plant Mol Biol* 65: 13–30. PMID: [17611800](#)
42. Stanne TM, Sjogren LL, Koussevitzky S, Clarke AK (2009) Identification of new protein substrates for the chloroplast ATP-dependent Clp protease supports its constitutive role in Arabidopsis. *Biochem J* 417: 257–268. doi: [10.1042/BJ20081146](#) PMID: [18754756](#)
43. Nishimura K, van Wijk KJ (2015) Organization, function and substrates of the essential Clp protease system in plastids. *Biochim Biophys Acta* 1847: 915–930. doi: [10.1016/j.bbabi.2014.11.012](#) PMID: [25482260](#)

44. Beck G, Coman D, Herren E, Ruiz-Sola MA, Rodriguez-Concepcion M, Gruissem W, et al. (2013) Characterization of the GGPP synthase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 82: 393–416. doi: [10.1007/s11103-013-0070-z](https://doi.org/10.1007/s11103-013-0070-z) PMID: [23729351](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23729351/)
45. Kuzuyama T, Shimizu T, Takahashi S, Seto H (1998) Fosmidomycin, a Specific Inhibitor of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase in the Nonmevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *Tetrahedron Letters* 39: 7913–7916.
46. Steinbacher S, Kaiser J, Eisenreich W, Huber R, Bacher A, Rohdich F (2003) Structural basis of fosmidomycin action revealed by the complex with 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase (IspC). Implications for the catalytic mechanism and anti-malaria drug development. *J Biol Chem* 278: 18401–18407. PMID: [12621040](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12621040/)
47. Rodriguez-Concepcion M, Fores O, Martinez-Garcia JF, Gonzalez V, Phillips MA, Ferrer A, et al. (2004) Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during *Arabidopsis* seedling development. *Plant Cell* 16: 144–156. PMID: [14660801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14660801/)
48. Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, et al. (2008) Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol* 148: 142–155. doi: [10.1104/pp.108.122770](https://doi.org/10.1104/pp.108.122770) PMID: [18614709](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18614709/)
49. Wang Y, Yu B, Zhao J, Guo J, Li Y, Han S, et al. (2013) Autophagy contributes to leaf starch degradation. *Plant Cell* 25: 1383–1399. doi: [10.1105/tpc.112.108993](https://doi.org/10.1105/tpc.112.108993) PMID: [23564204](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23564204/)
50. Spitzer C, Li F, Buono R, Roschztardt H, Chung T, Zhang M, et al. (2015) The endosomal protein CHARGED MULTIVESICULAR BODY PROTEIN1 regulates the autophagic turnover of plastids in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 27: 391–402. doi: [10.1105/tpc.114.135939](https://doi.org/10.1105/tpc.114.135939) PMID: [25649438](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25649438/)
51. Izumi M, Hidema J, Wada S, Kondo E, Kurusu T, Kuchitsu K, et al. (2015) Establishment of monitoring methods for autophagy in rice reveals autophagic recycling of chloroplasts and root plastids during energy limitation. *Plant Physiol* 167: 1307–1320. doi: [10.1104/pp.114.254078](https://doi.org/10.1104/pp.114.254078) PMID: [25717038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25717038/)
52. Wang S, Blumwald E (2014) Stress-induced chloroplast degradation in *Arabidopsis* is regulated via a process independent of autophagy and senescence-associated vacuoles. *Plant Cell* 26: 4875–4888. doi: [10.1105/tpc.114.133116](https://doi.org/10.1105/tpc.114.133116) PMID: [25538186](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25538186/)
53. Zybailov B, Rutschow H, Friso G, Rudella A, Emanuelsson O, Sun Q, et al. (2008) Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS ONE* 3: e1994. doi: [10.1371/journal.pone.0001994](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001994) PMID: [18431481](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18431481/)
54. Michaeli S, Honig A, Levanony H, Peled-Zehavi H, Galili G (2014) *Arabidopsis* ATG8-INTERACTING PROTEIN1 is involved in autophagy-dependent vesicular trafficking of plastid proteins to the vacuole. *Plant Cell* 26: 4084–4101. doi: [10.1105/tpc.114.129999](https://doi.org/10.1105/tpc.114.129999) PMID: [25281689](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25281689/)
55. Martinez DE, Costa ML, Gomez FM, Otegui MS, Guiamet JJ (2008) 'Senescence-associated vacuoles' are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves. *Plant J* 56: 196–206. doi: [10.1111/j.1365-3113.2008.03585.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2008.03585.x) PMID: [18564383](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18564383/)
56. Ramundo S, Casero D, Muhlhaus T, Hemme D, Sommer F, Crèvecoeur M, et al. (2014) Conditional Depletion of the *Chlamydomonas* Chloroplast ClpP Protease Activates Nuclear Genes Involved in Autophagy and Plastid Protein Quality Control. *Plant Cell* 26: 2201–2222. PMID: [24879428](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24879428/)

